
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
PROGRAMA DE DOCTORADO EN MEDICINA Y CIRUGÍA



**LINFOMA T PANICULÍTICO:
CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y MUTACIONAL
COMPARANDO CON PANICULITIS LÚPICA Y CASOS DE
SOLAPAMIENTO**

Memoria presentada por:

Salma Machan

Licenciada en Medicina y Cirugía

para optar al grado de Doctor por la Universidad Autónoma de Madrid

Directores:

Luis Requena Caballero

Socorro María Rodríguez Pinilla

Servicio de Dermatología

Servicio de Anatomía Patológica

Fundación Jiménez Díaz-UAM

Fundación Jiménez Díaz-UAM

Madrid, 2021

La presente tesis doctoral ha sido financiada con una ayuda del Instituto Carlos III del Ministerio de Educación y Ciencia con número PI17/2172.

A mi hijo Aaron.

AGRADECIMIENTOS

A mis directores, el Prof. Luis Requena y la Dra. María Rodríguez Pinilla. A Luis, gracias por todo, por haber hecho escuela, estoy muy orgullosa de formar parte de los “Requena Girls and Boys”. A María, gracias por ser una fuente explosiva de ideas y contagiar tu inquietud por el conocimiento.

A las Dras. Marta Rodríguez y Rebeca Manso, del Instituto de Investigación de la Fundación Jiménez Díaz (FJD), por todo vuestro trabajo en este proyecto y enseñarme tanto.

A Laura Cereceda, por la ayuda en la gestión de los datos y de los ánimos.

Al Dr. Miguel Ángel Piris, y al resto de su grupo, por su generosidad, ideas y aportaciones.

A todos los centros que nos han mandado casos, a Lorenzo Cerroni, José Luis Rodríguez Peralto, Candelaria García, Enrique García Toro, Teresa Estrach, Adriana García-Herrera, Berta Ferrer, Carlos González-Cruz, Vicente García-Patos, Nerea Segues, Juan Luis Afonso-Martin, Yeray Peñate, Carlos Monteagudo, Miguel Ángel Limeres-Gonzalez, María Ángeles González-Núñez y Ángeles Torres. Quisiera agradecer especialmente al Dr. Lorenzo Cerroni de la Universidad de Graz, Austria, por habernos cedido sus casos de solapamiento, y porque en sus trabajos previos, su libro y sus charlas hemos encontrado la inspiración para desarrollar este proyecto y muchos otros.

A todos los residentes y rotantes, Lucía Prieto, Joaquín Robles, Juan Torre, y todos los demás por vuestro entusiasmo y por hacer tantas preguntas.

A todo el equipo de Dermatología de la FJD, a los que estáis y a todos lo que habéis estado: por formarme, seguir formándome y formar parte de mi familia. Muy especialmente a las Dras. Maica Fariña y Loreto Carrasco, por contagiar conocimiento y valores.

Al Dr. Raúl Córdoba, por manejar a mi lado la consulta de linfomas cutáneos con tanto entusiasmo y por enseñarme Hematología y más sabiduría.

A todos los patólogos, en especial los dermatopatólogos y hematopatólogos, y técnicos, equipo de biología molecular de la FJD.

A los pacientes, tan importantes para la investigación biomédica, por vuestra generosidad.

A mis amigos, por vuestro apoyo.

A Sofia, por todo tu apoyo.

A mis hermanas, por estar siempre ahí.

A mis padres, por vuestro ejemplo, por vuestra dedicación, por vuestro apoyo, por hacer las cosas siempre fáciles.

A mi marido, por tu paciencia y tu apoyo imprescindible.

ÍNDICE

<i>Agradecimientos</i>	5
<i>Índice</i>	6
<i>Resumen/Summary</i>	9
<i>Abreviaturas</i>	12
<i>I- INTRODUCCIÓN</i>	19
1.1. Historia	20
1.2. Epidemiología.....	21
1.3. Etiología.....	22
1.4. Características clínicas.....	23
1.4.1. Síndrome hemofagocítico o hemofagocitosis linfohistiocítica.....	24
1.5. Características histopatológicas e inmunohistoquímicas del LTP	26
1.5.1. Características histopatológicas del LTP	26
1.5.2. Características inmunohistoquímicas del LTP.....	29
1.6. Casos de solapamiento	30
1.7. Características genotípicas del LTP.....	30
1.8. Diagnóstico diferencial del LTP	34
1.8.1. Diagnóstico diferencial con paniculitis inflamatorias.....	34
1.8.2. Diagnóstico diferencial con otros linfomas	37
1.9. Pronóstico, factores predictivos y tratamiento	40
1.10. Perspectivas, Medicina de precisión	41
1. 11. Caracterización molecular de linfoma T paniculítico	41
<i>2. OBJETIVOS</i>	43

3. MATERIALES Y MÉTODOS	45
3.1. Muestras de pacientes	46
3.2. Extracción de ARN	47
3.3. Ensayo de expresión génica mediante NanoString LST nCounter	47
3.4. Análisis estadístico	48
3.4.1. Análisis de enriquecimiento de conjuntos de genes	48
3.5. Estudio inmunohistoquímico	49
3.6. Transcripción inversa y PCR cuantitativa en tiempo real	51
3.7. Extracción de ADN	52
3.8. PCR para el reordenamiento del gen TCR	52
3.9. Secuenciación dirigida mediante NGS para el estudio de mutaciones	53
3.10. Estudio de pirosecuenciación del gen <i>HAVCR2</i>	54
4. RESULTADOS	57
4.1. Características clínicas	58
4.1.1. Características clínicas de los casos de linfoma T paniculítico	58
4.1.2. Características clínicas de los casos de paniculitis lúpica	60
4.1.3. Características clínicas de los casos de solapamiento	61
4.2. Características inmunohistoquímicas, hibridación in situ y PCR TCR	61
4.3.1. Características inmunohistoquímicas, hibridación in situ y PCR TCR de los linfomas T paniculíticos	61
4.3. Características moleculares	62
4.3.1. Firma molecular de expresión génica	62
4.3.2. Estudio mutacional	73
5. DISCUSIÓN	78
5.1. Genes sobreexpresados en linfoma T paniculítico	79
5.1.1. Citotoxicidad como firma molecular del LTP	79
5.1.2. Respuesta inmune tipo 1 como firma molecular de LTP	80

5.1.3.	Las células T CD8+ exhaustas y la sobreexpresión de los genes relacionados en LTP	81
5.1.4.	Sobreexpresión de genes relacionados con proliferación en LTP	83
5.2.	Genes sobreexpresados en paniculitis lúpica.....	83
5.2.1.	Sobreexpresión de genes de linfocitos B y células plasmáticas en LEP	83
5.2.2.	Sobreexpresión de genes relacionados con los mastocitos en LEP	83
5.2.3.	Sobreexpresión de los genes relacionados con las células dendríticas en LEP	84
5.2.4.	Sobreexpresión de los genes relacionados con la apoptosis en LEP.....	84
5.3.	Genes sobreexpresados en los casos asociados con SHF.....	85
5.4.	Casos de solapamiento y situación con respecto a la paniculitis lúpica y el linfoma T paniculítico.....	86
5.5.	Autoinmunidad y linfoma	86
5.6.	Mutaciones en LTP.....	87
5.6.1.	Mutaciones en Modificadores epigenéticos en LTP	87
5.6.2.	Mutaciones en TP53 en LTP.....	89
5.6.3.	Mutaciones en PLCG1 en LTP.....	90
5.6.4.	Mutaciones en HAVCR2 en LTP	90
5.6.5.	Dianas terapéuticas	91
6.	CONCLUSIONES	93
	BIBLIOGRAFÍA	95
	ANEXOS	121
	Anexo 1. Artículo original.....	122
	Anexo 2. Grupos de genes de las vías de señalización estudiadas mediante GSEA.....	133
	Anexo 3. Índice de Tablas	137
	Anexo 4. Índice de Figuras.....	138
	Anexo 5. Informe del Comité de Ética de la Investigación	140

RESUMEN/SUMMARY

RESUMEN

El linfoma T paniculítico (LTP) es un linfoma citotóxico cutáneo primario raro cuyo diagnóstico diferencial con la paniculitis lúpica, también denominada lupus eritematoso profundo (LEP), puede ser difícil. Además, se han descrito casos de solapamiento histopatológico entre estos dos procesos. En este estudio investigamos si el perfil de expresión génica utilizando una plataforma personalizada de NanoString puede ser útil para entender mejor la patogénesis de este linfoma y establecer un diagnóstico diferencial más preciso. Se analizaron 22 casos de LTP, LEP y casos de solapamiento utilizando una plataforma personalizada de NanoString que incluye 208 genes relacionados con la diferenciación de células T, firmas estromales, oncogenes y genes supresores de tumores. Además, se realizó estudio mutacional de un subgrupo de 6 casos de LTP. El análisis no supervisado de la expresión génica de las muestras identificó tres grupos que permitían diferenciar las muestras de LTP de las de LEP. La mayoría de los casos de solapamiento (4/5) se agruparon con los casos de LEP, y sólo un caso se agrupó con los casos de LTP. Identificamos 60 y 30 genes que estaban respectivamente regulados al alza y a la baja en el LTP en relación con el LEP. Se observaron genes diferencialmente expresados al comparar los casos de solapamiento con los de LEP. El análisis de enriquecimiento del conjunto de genes reconoció conjuntos de genes que definían cada grupo. El estudio mutacional mostró mutaciones en genes modificadores epigenéticos *ARID1A*, *EZH2*, *TET2*, *DNMT3A* y *NCOR1*; el gen supresor de tumores *TP53* y el gen *PLCG1* en cuatro de las seis muestras de LTP analizadas. Solo un caso mostró mutación en el gen *HAVCR2*. En conclusión, el LTP y el LEP tienen perfiles moleculares distintivos. La base molecular de los casos de solapamiento se asemeja más al LEP que al LTP.

SUMMARY

Subcutaneous panniculitis-like T-cell lymphoma (SPTCL) is a rare cytotoxic primary cutaneous lymphoma whose histopathologic differential diagnosis with lupus erythematosus panniculitis (LEP) can be challenging, and overlapping cases have been described. In this study we investigate whether gene expression profiling using a customized NanoString platform may identify markers that can be used to improve our understanding of the disease and to make a more precise differential diagnosis. Twenty-two cases of SPTCL, LEP and overlapping cases were analyzed using a customized NanoString platform that includes 208 genes related to T-cell differentiation, stromal signatures, oncogenes and tumor suppressor genes. In addition, a mutational study of a subgroup of 6 cases has been made. Unsupervised analysis of the gene expression of the samples identified three clusters of samples that differentiated SPTCL from LEP samples. Most overlapping cases (4/5) were clustered with LEP cases, and only one case was grouped with the SPTCL cases. We identified 60 and 30 genes that were respectively upregulated and downregulated in SPTCL compared with LEP. Differentially expressed genes were observed when comparing overlapping with LEP cases. Gene set enrichment analysis recognized gene sets defining each group. We identified mutations in epigenetic modificatory genes ARID1A, EZH2, TET2, DNMT3A, and NCOR1; the tumor suppressor gene TP53, and PLCG1 gene in four out of the six SPTCL samples analyzed. Only one case showed HAVCR2 mutation. In conclusion, SPTCL and LEP have distinctive molecular profiles. The molecular background of overlapping cases more closely resembles LEP than it does SPTCL.

ABREVIATURAS

Se han utilizado las abreviaturas y acrónimos más frecuentemente usados en la literatura, correspondiendo algunos a términos en inglés. En el texto, aquellas abreviaturas y acrónimos correspondientes a genes se indican en cursiva (ej. *CXCL13*), las correspondientes a proteína en fuente normal (ej. CXCL13).

+	positivo
-	negativo
ADN	ácido desoxirribonucleico
ADNc	ácido desoxirribonucleico complementario
ADNg	ácido desoxirribonucleico genómico
Akt	proteína quinasa B
alo-TPH	trasplante de progenitores hematopoyéticos alogénico
ARN	ácido ribonucleico
ARNm	ácido ribonucleico mensajero
auto-TPH	trasplante de progenitores hematopoyético autólogo
CCR4	receptor de citoquinas tipo 4
CCR5	receptor de citoquinas tipo 5
CD123	anticuerpo CD123, subunidad alfa del receptor de la interleuquina-3 humana
CD45RA	anticuerpo CD45RA (220kDa)

CD45RO	anticuerpo CD45RO (180-185 kDa)
CD7	antígeno de superficie de células T Leu-9
CDP	célula dendrítica plasmacitoide
cm	centímetros
CXCL13	ligando 13 de citoquinas
DNMT3A	ADN metiltransferasa 3 alfa
EBV	virus de Epstein Barr, del inglés <i>Epstein Barr virus</i>
EE	enfermedad estable
EOMES	eomesodermina
EORTC	Organización Europea de Investigación y Tratamiento del Cáncer, del inglés <i>European Organization for Research and Treatment of Cancer</i>
ES	puntaje de enriquecimiento, del inglés, <i>enrichment score</i>
EZH2	potenciador de zeste homólogo 2
FA	frecuencia alélica
FDR	tasa de descubrimiento falso, del inglés, <i>false discovery rate</i>
FFIP	fijado en formol e incluido en parafina
FFPE	fijado en formol e incluido en parafina; del inglés, <i>formalin-fixed, paraffin-embedded</i>
FJD	Fundación Jiménez Díaz
FOXP3	proteína P3 de la Forkhead box
FW	cebador directo, del inglés <i>forward primer</i>
G	línea germinal
GATA3	factor de transcripción específico de células T transactivadas

GED	gen expresado diferencialmente
GNLY	granulosina
GSEA	análisis de enriquecimiento de grupo de genes, del inglés, <i>gene set enrichment analysis</i>
GZMA	granzima A
GZMB	granzima B
GZMH	granzima H
HDL	lipoproteínas de alta densidad, del inglés <i>high density lipoprotein</i>
HLH	hemofagocitosis linfocitica
IDH2	isocitrato deshidrogenasa 2
IFN	interferón
IGF1	factor de crecimiento insulínico tipo 1
IHQ	inmunohistoquímica
IL-1	interleuquina 1
IL-2	interleuquina 2
IL10	interleuquina 10
IPI	índice de pronóstico internacional
KIR2DL3	receptor de células NK similares a inmunoglobulina, 2 dominios Ig y un apéndice citoplasmático largo, del inglés, <i>Killer Cell Immunoglobulin Like Receptor, Two Ig Domains And Long Cytoplasmic Tail 3</i> .
KO	del inglés, <i>knock-out</i> , que significa inactivado
LACG-CP	linfoma anaplásico de células grandes cutáneo primario

LAG3	gen 3 de activación de linfocitos, del inglés, <i>lymphocyte-activation gene 3</i>
LBDCG	linfoma B difuso de células grandes
LCCT	linfoma cutáneo de células T
LCT-GDCP	linfoma de células T gamma-delta cutáneo primario
LDH	lactato deshidrogenasa
LE	lupus eritematoso
LEC	lupus eritematoso cutáneo
LECC	lupus eritematoso cutáneo crónico
LEP	lupus eritematoso profundo
LES	lupus eritematoso sistémico
LNKTE-tn	linfoma NK/T extranodal asociado a EBV+, tipo nasal
LE	lupus eritematoso
LEP	lupus eritematoso profundo, lupus eritematosos paniculítico, paniculitis lúpica
LES	lupus eritematoso sistémico
LLC	leucemia linfática crónica
LMA	leucemia mieloide aguda
LMMC	leucemia mielo-monocítica crónica
LNH	linfoma no Hodgkin
LNH-T	linfomas no Hodgkin de células T
LTGDCP	linfoma de células T gamma-delta cutáneo primario
LTP	linfoma T paniculítico; linfoma subcutáneo de células T simulando linfoma

LT _{reg}	linfocitos T reguladores
MF	micosis fungoide
mm	milímetros
MM	mieloma múltiple
mTOR	mecanicista / mamífero de las vías de señalización de la rapamicina
MW	macroglobulinemia de Waldenström
MxA	proteína de resistencia al mixovirus 1
NAV3	navegador neuronal 3, en inglés, <i>neuron navigator 3</i>
NES	puntaje de enriquecimiento normalizado, del inglés, <i>normalized enrichment score</i>
NF-κB	factor nuclear kappa B
NGS	secuenciación de última generación, del inglés <i>next generation sequencing</i>
NK	<i>natural killer</i>
NKG7	proteína 7 de gránulos de célula natural killer, del inglés, <i>Natural Killer Cell Granule Protein 7</i>
OMS	Organización Mundial de la Salud
OV	caso de solapamiento, del inglés, <i>overlapping</i>
p.b.	pares de bases
PCR	reacción en cadena de la polimerasa, del inglés <i>polymerase chain reaction</i>
PI3K	fosfoinositol 3-quinasa
PLC	fosfolipasa C
PLCG1	fosfolipasa C gamma 1

PRF1	perforina 1
PTCL	linfoma T periférico, del inglés <i>PTCL, peripheral T cell lymphoma</i>
qPCR	PCR cuantitativa
R	reordenado
RC	respuesta completa
RELA	subunidad de NF-κB, factor de transcripción p65
RP	respuesta parcial
Rt-PCR	reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real, del inglés <i>real time polymerase chain reaction</i>
RV	cebador inverso; del inglés, <i>reverse primer</i>
s	segundos
SHF	síndrome hemofagocítico
SMD	síndrome mielodisplásico
SNV	variante de nucleótido único del inglés <i>single nucleotid variants</i>
SPTCL	linfoma T paniculítico, del inglés <i>subcutaneous panniculitis-like T-cell lymphoma</i>
SS	Síndrome de Sézary
TBX21	factor de transcripción T-box
TCR	receptor de membrana de célula T, del inglés, <i>T-cell receptor</i>
TCS	tejido celular subcutáneo
TET2	tet metilcitosina dioxigenasa 2, <i>ten-eleven translocation 2</i>
T _{FH}	linfocito T colaborador folicular, del inglés, <i>T follicular helper</i>
TG	triglicéridos

Th	linfocito T colaborador, del inglés, <i>T helper cell</i>
Th1	linfocito T colaborador tipo 1, del inglés, <i>T helper cell type 1</i>
Th2	linfocito T colaborador tipo 1, del inglés, <i>T helper cell type 2</i>
TIA-1	antígeno intracelular restringido a célula T
TP53	supresor tumoral p53
TPH	trasplante de progenitores hematopoyéticos
VAF	frecuencia alélica variable, del inglés <i>variable allelic frequency</i>
VEB	virus de Epstein-Barr
VEGF	factor de crecimiento endotelial vascular
VLDL	lipoproteína de muy baja densidad, del inglés, <i>very low density lipoprotein</i>
WES	Secuenciación de exoma completo, del inglés, <i>whole exome sequencing</i>
WT	wild type, del inglés tipo salvaje

CÓDIGOS DE UNA Y TRES LETRAS PARA LOS AMINOÁCIDOS

Alanina	Ala, A	Leucina	Leu, L
Arginina	Arg, R	Lisina	Lys, K
Ácido aspártico	Asp, D	Metionina	Met, M
Asparagina	Asn, N	Fenilalanina	Phe, F
Cisteína	Cys, C	Prolina	Pro, P
Ácido glutámico	Glu, E	Serina	Ser, S
Glicina	Gly, G	Tirosina	Tyr, Y
Glutamina	Gln, Q	Treonina	Thr, T
Histidina	His, H	Triptófano	Trp, W
Isoleucina	Ile, I	Valina	Val, V
Terminación	Ter, *		

I-INTRODUCCIÓN

El linfoma T paniculítico (LTP) es un linfoma de células T CD8 TCR alfa-beta citotóxico que afecta característicamente el tejido celular subcutáneo. Las células neoplásicas son células linfoides atípicas de tamaño variable, con actividad apoptótica prominente y causan necrosis adipocitaria de los lobulillos asociados. El LTP muestra una amplia distribución por edades, habiéndose descrito casos tanto en la infancia como en adultos. En el 20% de los casos se asocia a enfermedades autoinmunes, generalmente, lupus eritematoso sistémico [1]. El diagnóstico diferencial con la paniculitis lúpica, también denominada lupus eritematoso profundo (LEP), puede ser difícil; y además se han descrito casos de solapamiento histopatológico [2,3]. No se sabe si estos casos de solapamiento corresponden a: a) LTPs con rasgos histopatológicos de LEP, b) LEPs atípicos con rasgos histopatológicos de LTP, o c) una “transición” entre ambas entidades en un espectro continuo de enfermedad como se ha propuesto previamente [4,5].

La patogenia del LTP aún es desconocida en gran parte porque se han realizado pocos estudios moleculares. Un estudio de hibridación genómica comparada ha revelado un perfil distintivo de pérdidas y ganancias de genes [6], y se han descrito mutaciones germinales y somáticas [7–11]. Solo existe un trabajo previo de perfil de expresión génica, que estudió cuatro casos de LTP comparados con tejido celular subcutáneo normal y eritema nudoso [12].

1.1. HISTORIA

En 1991, González *et al.* describieron una serie de casos de un nuevo tipo de linfoma cutáneo de células T (LCCT) con características clinicopatológicas que simulaban una paniculitis, se asociaba frecuentemente a SHF y presentaba un curso clínico agresivo [13]. Posteriormente, la entidad fue reconocida formalmente por la Organización Europea de Investigación y Tratamiento del Cáncer (EORTC, del inglés *European Organization for Research and Treatment of Cancer*) e incluida en la clasificación de la Organización Mundial de la Salud (OMS) de 2001 de los tumores hematopoyéticos y linfoides [14,15]. Sin embargo,

publicaciones posteriores de casos aislados y series de casos sugirieron que existían dos subgrupos distintos de esta entidad: un subtipo con inmunofenotipo de linfocito T alfa-beta, caracterizado por un curso generalmente más indolente y un mejor pronóstico, y un subtipo gamma-delta con un pronóstico mucho peor [16–19]. Como hemos mencionado previamente, el término LTP ahora se utiliza exclusivamente para referirse al subtipo alfa-beta, y el subtipo gamma-delta se denomina linfoma de células T gamma-delta cutáneo primario (LCT-GDCP), tanto en la clasificación OMS-EORTC de 2005 [20], como en la revisión de 2016 de la Clasificación de la OMS de Tumores del Tejido Hematopoyético y Linfoide [1].

Algunos casos de LTP fueron descritos en el pasado con diversas denominaciones, incluyendo “paniculitis histiocítica citofágica” [21,22], “paniculitis fatal” [23] o “paniculitis de Weber-Christian” [24]. Sin embargo, no todos los casos descritos con estas denominaciones cumplirían los criterios que actualmente se requieren para establecer el diagnóstico de LTP, y probablemente algunos de estos casos serían ahora mejor clasificados como LCT-GDCP o linfoma NK/T extranodal asociado a EBV+, tipo nasal (LNKTE-tn) que presentan afectación paniculítica frecuentemente [25]. Además, el estudio inmunofenotípico de las células neoplásicas en algunos de estos estudios había sido incompleto o no se había llevado a cabo, lo que no permite establecer con seguridad un diagnóstico definitivo de los casos descritos en la literatura según los criterios actuales [26].

1.2. EPIDEMIOLOGÍA

El LTP es una forma rara de linfoma cutáneo primario, constituyendo el 0,9% de los linfomas de células T maduras en adultos [27]. Es ligeramente más frecuente en mujeres que en hombres y presenta un rango de edad muy amplio [28]. Aproximadamente el 20% de los pacientes son menores de 20 años (mediana: 35 años) [19], y también puede presentarse en la infancia [29]. Entre 20% y el 40% de

los pacientes padecen una enfermedad autoinmune asociada [5,28], siendo el lupus eritematoso sistémico (LES) la más frecuente. Otras enfermedades autoinmunes asociadas descritas en pacientes con LTP son artritis reumatoide [19,30], diabetes tipo 1, esclerosis múltiple, síndrome de Sjögren [31], dermatomiositis [32], enfermedad mixta del tejido conectivo [25], sarcoidosis [33] y enfermedad de Kikuchi [5,19]. Existe un caso descrito asociado a artritis reumatoide juvenil en tratamiento con tocilizumab [34]. En la actualidad, existe controversia respecto a si esta asociación puede deberse a una desregulación del sistema inmune relacionada con la enfermedad de base o a los tratamientos empleados (por ejemplo, anti-TNF-alfa).

Se ha observado una mayor frecuencia relativa de LTP en población asiática con respecto a la de Occidente [35].

1.3. ETIOLOGÍA

La etiología del LTP es desconocida. Se ha postulado que la enfermedad autoinmune puede tener un papel etiopatogénico en algunos casos. Las lesiones pueden mostrar características histopatológicas de solapamiento con casos de lupus paniculítico y el diagnóstico de una enfermedad autoinmune sistémica asociada, generalmente lupus eritematoso sistémico (LES), se ha documentado en aproximadamente el 20% de los casos [4,19,36], alcanzando el 40% en una serie francesa [5]. En algunos pacientes, las lesiones iniciales pueden simular una paniculitis lobulillar no neoplásica. Además, se ha observado que algunos pacientes con paniculitis lúpica bien documentada desarrollan LTP con reordenamiento de TCR monoclonal después de más de 10 años de seguimiento. No está claro si una paniculitis lobulillar benigna puede preceder el desarrollo de un LTP en pacientes sin LES. A diferencia del LNKTE-tn, el virus de Epstein-Barr (VEB) está ausente en el LTP [19]. Aunque los mecanismos exactos que utilizan las células neoplásicas para migrar hacia la hipodermis son aún desconocidos, se postula que la expresión de CCR5 en las células neoplásicas T y

sus ligandos (CCL3, CCL4 y CCL5), que se encuentran en la membrana de los adipocitos activados, puede contribuir a la patogénesis del LTP [37,38]. Se ha observado una regulación al alza de *IDO-1* (indolamina 2,3-dioxigenasa), una enzima inductora de inmunotolerancia, y genes específicos de linfocito T colaborador tipo 1 (Th1) inducible por IFN [12].

1.4. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS

Los pacientes con LTP presentan múltiples nódulos subcutáneos o placas eritematosas o contusiformes, generalmente sin otras lesiones extracutáneas. Las localizaciones más frecuentes son las extremidades y el tronco; y, menos frecuentemente, la cara. Los nódulos pueden medir entre 0.5 mm y 20 cm de diámetro. Los nódulos más grandes pueden necrosarse, aunque la ulceración es rara [19,28] y pueden involucionar dejando lipoatrofia residual [19]. Es raro que los pacientes presenten lesiones solitarias [19]. Se han descrito presentaciones clínicas raras en forma de alopecia de cuero cabelludo [39], o simulando úlceras venosas [40].

La presentación clínica más frecuente es en forma de nódulos subcutáneos. Hasta un 50% de los pacientes pueden presentar síntomas sistémicos asociados, como fiebre, fatiga y pérdida de peso. Las alteraciones de laboratorio incluyendo las citopenias y la alteración de la función hepática son comunes. En un 15-20% de los casos puede observarse un claro SHF [19,41]. Estos casos pueden presentar esplenomegalia y hepatomegalia, aunque generalmente no se debe a infiltración por el linfoma. La afectación ganglionar suele estar ausente. La afectación de médula ósea se ha descrito en raras ocasiones, con participación de las células adiposas del espacio medular [28].

El estudio de extensión debe realizarse en todos los pacientes, incluyendo la biopsia de médula ósea en busca de datos de SHF, ya que esto va a determinar el pronóstico [42]. Algunos autores recomiendan la realización de un PET-FDG

para determinar si existe afectación multifocal [42] y para la monitorización de la respuesta terapéutica [43].

1.4.1. SÍNDROME HEMOFAGOCÍTICO O HEMOFAGOCITOSIS LINFOHISTIOCÍTICA

El SHF, también denominado hemofagocitosis linfohistiocítica (HLH), fue descrito por Scott y Robb-Smith en 1939. Se caracteriza por una estimulación continua de los linfocitos citotóxicos (como las células T CD8+ y NK) por las células presentadoras de antígeno [44,45].

Criterios diagnósticos de SHF

- Diagnóstico molecular consistente con SHF (SHF primario).
- Criterios clínicos y analíticos: se requieren 5 de los 8 criterios (SHF secundario) (Tabla 1).
- Otros criterios: síntomas leptomeníngeos, linfadenopatías, ictericia, edema, exantema cutáneo, función hepática alterada, hipoproteinemia, niveles VLDL elevados, niveles HDL bajos.

TABLA 1. CRITERIOS CLÍNICOS Y ANALÍTICOS DEL SÍNDROME HEMOFAGOCÍTICO

<i>Criterios clínicos</i>	1. Fiebre
	2. Esplenomegalia
<i>Criterios de laboratorio</i>	3. Citopenias de al menos dos líneas en sangre periférica <ul style="list-style-type: none"> - Hemoglobina < 90 g/L - Plaquetas < 100 x 10⁹/L - Neutrófilos < 1000/L
	4. Hipertrigliceridemia y/o hipofibrinogenemia: <ul style="list-style-type: none"> - TG > 265 mg/dL (en ayunas) - Fibrinógeno < 1,5 g/L
	5. Hemofagocitosis en médula ósea, bazo o ganglios
	6. Actividad de células NK ausente o baja
	7. Hiperferritinemia (> 500 mg/L)
	8. Receptor de IL-2 soluble (sCD25) alto (>2400 U/mL)

Causas de SHF

SHF primario

Existen formas primarias hereditarias de SHF determinadas genéticamente que suelen manifestarse en el primer año de vida y que son causadas principalmente por defectos en genes relacionados con citotoxicidad dependiente de gránulos de los linfocitos como la perforina [46].

SHF secundario o adquirido

La forma secundaria afecta a todos los grupos de edad. Las tasas de incidencia son desconocidas [47]. El SHF secundario puede asociarse a neoplasias, tanto hematológicas [enfermedad de Hodgkin [48], otros LCCT (incluyendo el LCT-GDCP y el LNKTE-tn), LLC, leucemia linfoblástica aguda, linfoma linfoblástico, linfoma T periférico] como no hematológicas (carcinoma gástrico); infecciones por virus (VEB, CMV), bacterias, hongos o protozoos (leishmaniasis) [48]; u otras enfermedades como el LES [48], la enfermedad de Kikuchi-Fujimoto [49], la anemia de células falciformes [50]; o a tratamientos como los anti-TNF-alfa [51] o la quimioterapia.

SHF asociado a linfoma T paniculítico

La presencia de SHF empeora el pronóstico del LTP pasando de una supervivencia a los 5 años del 91 al 50% cuando se comparan los pacientes sin y con SHF respectivamente [19]. Conviene recordar que otros linfomas más agresivos se asocian con más frecuencia al SHF que el LTP.

Se ha descrito una forma hereditaria autosómica recesiva de LTP asociado a SHF que resulta del déficit de la proteína transmembrana TIM-3, codificada por el gen *HAVCR2* que produce una activación inmune descontrolada [8]. Se han identificado variantes con cambio de sentido en línea germinal de LTP que provocan la alteración de residuos altamente conservados de TIM-3, c.245A> G (p.Tyr82Cys) y c.291A> G (p.Ile97Met), cada uno con distribución geográfica particular. La variante que codifica TIM-3 p.Tyr82Cys ocurre en un potencial

cromosoma fundador en pacientes con ascendencia asiática oriental y polinesia, mientras que TIM-3 p.Ile97Met ocurre en pacientes con ascendencia europea. Ambas variantes inducen un plegamiento incorrecto de la proteína y anulan la expresión de la membrana plasmática de TIM-3, que conduce a una activación inmunitaria persistente y un aumento de la producción de citoquinas inflamatorias, incluido el factor de necrosis tumoral- α y la interleucina-1 β , que promueven el SHF y el LTP.

Sin embargo, estas mutaciones en *HAVCR2* se han descrito posteriormente en casos esporádicos de LTP y su asociación con SHF es controvertida [9,11].

Tratamiento SHF

El tratamiento del SHF es el de la causa subyacente. Las opciones terapéuticas disponibles son inmunoglobulinas, ciclosporina A, globulina antitimocítica, corticoides (en monoterapia o en combinación con metotrexato), etopósido y trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos [52].

1.5. CARACTERÍSTICAS HISTOPATOLÓGICAS E INMUNOHISTOQUÍMICAS DEL LTP

1.5.1. CARACTERÍSTICAS HISTOPATOLÓGICAS DEL LTP

El LTP es un linfoma de células T CD8 TCR alfa-beta citotóxico que afecta exclusivamente al tejido celular subcutáneo. El infiltrado afecta a los lobulillos del tejido celular subcutáneo, generalmente respetando los septos, mostrando un patrón histopatológico que simula una paniculitis lobulillar. La dermis y epidermis suprayacentes suelen estar respetados, aunque ocasionalmente puede verse afectación de la dermis profunda con acentuación del infiltrado alrededor de los ovillos ecrinos, los folículos pilosos y las glándulas sebáceas [19,53]. En ocasiones, se observan características histopatológicas que simulan paniculitis lúpica como la presencia de una dermatitis de interfase o el depósito de mucina intersticial [54,55].

Células neoplásicas

Las células neoplásicas son de tamaño variable de unos casos a otros, aunque en un mismo caso, suelen ser de tamaño uniforme. Sin embargo, se puede observar cierto grado de pleomorfismo. Suelen tener núcleos irregulares e hipercromáticos y un anillo de citoplasma pálido. En la mayoría de los casos se observan células de tamaño pequeño o mediano acompañantes y sólo algunas células grandes salpicadas con citoplasma claro.

“Rimming” o ribeteado de los adipocitos

Una clave histopatológica diagnóstica de LTP es la disposición de los linfocitos atípicos alrededor de los adipocitos bordeándolos, lo que se denomina *rimming* (*rim* significa borde en inglés). A veces, se observa sólo focalmente. Sin embargo, no es completamente específico de LTP y se ha observado en otras entidades tanto malignas como benignas. Este ribeteado se ha descrito en otros linfomas cutáneos tanto primarios como secundarios como la micosis fungoide (MF) en estadio tumoral, el linfoma de células T CD8+ epidermotropo agresivo (linfoma de Berti), el LCT-GDCP, el LTNKE-t_n, la neoplasia de células dendríticas plasmacitoides blásticas, el linfoma B difuso de células grandes cutáneo secundario, el linfoma linfoplasmacítico cutáneo secundario, la infiltración cutánea específica de LMA [56] y el linfoma del manto [57]. Estas entidades no suelen mostrar afectación subcutánea exclusiva y el estudio del inmunofenotipo permite establecer el diagnóstico correcto. El ribeteado o *rimming* de los adipocitos se ha descrito también en algunos casos de paniculitis asociada a lupus eritematoso y dermatomiositis [36], aunque estos linfocitos que rodean a los adipocitos no suelen mostrar el grado de atipia que se observa en el LTP y en el caso de estas paniculitis, además de linfocitos, se observan también histiocitos y células plasmáticas formando este *rimming*. Otras paniculitis lobulillares como la paniculitis lipoatrófica de los tobillos de la infancia también puede mostrar este ribeteado [58].

Histiocitos

Frecuentemente se observan histiocitos reactivos entremezclados, sobre todo en las áreas de infiltración y destrucción de adipocitos. Los histiocitos generalmente muestran un aspecto espumoso de su citoplasma debido a la ingesta de material lipídico proveniente de la necrosis de adipocitos. Además, suelen observarse muchos cuerpos apoptóticos en su interior. Las células multinucleadas son poco frecuentes. Se ha descrito una minoría de casos con granulomas [19,59].

Células plasmáticas

Las células plasmáticas generalmente están ausentes en el LTP. En la mayoría de los casos de la serie de Willemze *et al.*, las células plasmáticas eran escasas, sin embargo 7/63 casos mostraban una proporción razonable de células plasmáticas en el infiltrado, y de estos casos, seis se asociaban a LE o fueron diagnosticados inicialmente como LEP [19].

Células dendríticas plasmacitoides

Las células dendríticas plasmacitoides suelen estar ausentes en LTP. Por el contrario, en el LEP se identifican grupos de más de 10 células dendríticas plasmacitoides que se tiñen clásicamente con CD123 [1,2,60].

Necrosis

La necrosis es común y puede ser tan prominente que enmascare las características histopatológicas específicas del LTP. En estos casos, los linfocitos atípicos en pequeños agregados en las zonas de necrosis y las “células fantasma” que resultan de la necrosis de los linfocitos constituyen el infiltrado [26]. En algunos casos se ha descrito necrosis grasa lipomembranosa [61].

Otras características histopatológicas

En algunos casos puede observarse invasión vascular [1] aunque es poco frecuente. Sin embargo, no es raro observar vasos necróticos con trombos intraluminales en las zonas de necrosis [26]. La cariorrexis es común [62] y representa un hallazgo útil en el diagnóstico diferencial con otros linfomas que

afectan a la piel y al tejido celular subcutáneo [28]. Se han descrito casos con presencia de mucina intersticial, aunque suele ser un hallazgo más frecuente en LEP [53].

Generalmente no se observan neutrófilos ni eosinófilos, aunque pueden existir neutrófilos salpicados en las áreas de necrosis [19].

1.5.2. CARACTERÍSTICAS INMUNOHISTOQUÍMICAS DEL LTP

Las células neoplásicas tienen un inmunofenotipo de célula T madura que expresa TCR alfa-beta, generalmente CD8+ /CD4- con expresión de moléculas citotóxicas incluyendo granzima B, perforina y TIA-1 [16,19,28]. Se ha observado pérdida de CD2, CD5 y/o CD7 en el 10%, 50% y 44% de los casos, respectivamente. El fenotipo suele ser CD45RO+, CD45RA- y CD30-, aunque hay casos raros CD30+. CD56 suele ser negativo, aunque se ha observado su expresión en algunas de las células neoplásicas en 1/61 casos. BetaF1 es positivo en las células neoplásicas CD8+, aunque ocasionalmente esta positividad solo se observa en menos del 50% de las células [19].

Ki67

El alto índice proliferativo de las células neoplásicas que forman el ribeteado de los adipocitos es una de las claves diagnósticas del LTP para establecer el diagnóstico diferencial con LEP. En el estudio de Willemze *et al.* solo 6/53 mostraron una positividad de menos del 25%. Se considera demostrativa la positividad de Ki67 de más del 30% de los núcleos de los agregados linfoides subcutáneos CD8+, lo que se ha denominado “Ki67 hotspot” [54].

TCR gamma-delta

Este marcador debe ser negativo, por definición, en LTP. Sin embargo, se ha descrito la presencia de linfocitos TCR gamma-delta hasta en un 10-15% de las células del infiltrado [63].

CD123

Este marcador se utiliza habitualmente para identificar células dendríticas plasmacitoides. Suele ser negativo en LTP [64], aunque a veces puede ser positivo [54,55,60].

EBER-1

Aunque el VEB generalmente está ausente en LTP, se han descrito algunos casos de LTP con activación del VEB, especialmente en la población asiática [1,2]. En estos casos, conviene descartar una inmunodeficiencia (iatrogénica o no iatrogénica) [26]. Sin embargo, según la última clasificación de la OMS, el VEB debe ser negativo en LTP [1].

1.6. CASOS DE SOLAPAMIENTO

Se han descrito casos de solapamiento de LTP y LEP [2,3,56,66–69]. Teniendo en cuenta esta asociación, algunos investigadores han propuesto que las dos procesos pertenecen al mismo espectro de enfermedad, y los casos con características superpuestas deberían denominarse “paniculitis lobulillar linfocítica atípica” o “discrasia de linfocitos T subcutánea” [4,54,66,68]. Otras posibilidades son que los casos de solapamiento sean en realidad LEP con rasgos histopatológicos de LTP, LTP con rasgos histopatológicos de LEP, una especial predisposición a que los pacientes con una enfermedad desarrollen la otra o, simplemente, un diagnóstico erróneo [3].

1.7. CARACTERÍSTICAS GENOTÍPICAS DEL LTP

Las células neoplásicas muestran reordenamiento de los genes TCR y son negativas para las secuencias del VEB. Se han observados diferentes poblaciones clonales de células T en la biopsia original y una biopsia del mismo paciente siete años más tarde [29].

Mediante hibridación genómica comparada (CGH, del inglés, *comparative genomic hybridization*), se han observado ganancias en 5q y 13q características del

LTP [6]. Los hallazgos de CGH más comunes fueron las pérdidas del número de copias de ADN en los cromosomas 1p (6/6 casos), 2p (5/6), 2q (4/6), 5p (5/6), 7p (4/6), 9q (5/6), 10q (5/6), 11q (5/6), 12q (5/6), 16 (5/6), 17q (4/6), 19 (4/6), 20 (6/6), 22 (6/6) y las ganancias en los cromosomas 2q (5/6), 4q (5/6), 5q (4/6), 6q (4/6), y 13q (4/6). Algunas de estas alteraciones, como las pérdidas de 10q, 17p y el cromosoma 19, han sido descritas previamente en otros LCCT (micosis fungoide [MF] y síndrome de Sézary [SS]) [6].

Se ha descrito la delección de NAV3 en el 11 y el 44% de los casos de LTP mediante secuenciación dirigida [7], e hibridación de fluorescencia in situ (FISH) y análisis de pérdida de heterocigosidad [6], respectivamente. La delección del gen NAV3, también se ha detectado en MF y SS [70].

Li *et al.* coleccionaron 18 casos de LTP con tejido tumoral FFIP [7]. Se utilizaron muestras de 10 LTP fijados en formol e incluidos en parafina y 3 de sangre completa normal emparejada para la secuenciación del exoma completo (WES). Se validaron 560 genes mediante secuenciación dirigida en 8 pacientes independientes con su control normal combinado. Mediante WES, se observó gran heterogeneidad en el panorama mutacional. Las mutaciones más comunes descritas previamente en otros linfomas de células T [71] como *TP53*, *DNMT3A*, *PLCG1*, *STAT3* y *CDKN2A*, no se observaron con frecuencia en los 10 casos estudiados. El análisis de vías de señalización de 202 genes mutados reveló que hubo un enriquecimiento significativo de los genes involucrados en PI3K/ Akt / mTOR y JAK-STAT ($p < 0001$). En este estudio, las muestras de ADN normal y tumoral extraídas de 8 casos de LTP independientes se sometieron a secuenciación dirigida para validación. Se encontraron mutaciones en modificadores epigenéticos en 13 de 18 casos (72%). Estos modificadores están involucrados en la maquinaria epigenética a casi todos los niveles, incluidos los actores clave en la organización de la cromatina (*ARID1B*, 3/18; *SMARCA4*, 3/18; y *CHD4*, 3/18), metilación del ADN (*MBD1*, 1/18), y modificación de histonas

(*CREBBP*, 2/18; *KMT2D*, 2/18; y *DOT1L*, 2/18). Además, se identificaron mutaciones recurrentes en genes que codifican componentes de la vía de señalización PI3K / AKT / mTOR en 8 de 18 (44%) casos de LTP. Finalmente, el estudio inmunohistoquímico mostró que los tumores con mutaciones PI3K / Akt / mTOR exhibían niveles más altos de fosforilación de AKT1 y 4E-BP1 (también denominado EIF4BP1) que los tumores sin las mutaciones. Las mutaciones somáticas que afectan a *JAK3* (3/18), *STAT3* (1/18) e *IL7R* (1/18), se hallaban en el 28% (5 de 18) de los casos [6].

Gayden *et al.* [8] detectaron mutaciones germinales en *HAVCR2*, gen que codifica TIM-3 (del inglés, *T-cell immunoglobulin mucin 3*) en 16 de los 27 pacientes estudiados, la mayoría asociados a SHF. TIM-3 es una proteína transmembrana, miembro de la familia TIM, expresada por los linfocitos T CD8+ y células NK; y actúa como un punto de control inmune negativo a través de interacciones con ligandos afines, como la galectina-9. Está implicada en la regulación de la tolerancia periférica, la inmunidad antitumoral y la respuesta inmune innata [72–74]. En este estudio, observaron que comparados con los casos de LTP TIM-3 *wild-type* (WT, del inglés, tipo salvaje), los pacientes con TIM-3-mutado tenían una edad de inicio más temprana (15 frente a 41 años), con inicio por debajo de los 22 años en 10 de los casos, una mediana de tiempo entre la aparición de la clínica y el diagnóstico más larga (10 meses frente a 3 meses), y un curso de la enfermedad más grave. Además, la mayoría de los LTP TIM-3-mutado presentaron SHF (14/16 frente a 3/11; $p<0.01$) y presencia de linfocitos tumorales alrededor de los adipocitos en la médula ósea (11/13 frente a 0/11; $p<0,0001$). Estos hallazgos se validaron mediante estudio inmunohistoquímico empleando anti-TIM3. En todos los casos TIM-3-mutado presentaban un patrón de tinción citoplasmático en forma de agregado alrededor del aparato de Golgi con poca expresión en la membrana plasmática; frente a los casos de TIM-3-salvaje en los que se observa una tinción de membrana. Además, en 3 casos se realizó

citometría de flujo y observaron la ausencia de expresión de TIM-3 en los monocitos (CD14+) y las células CD4+ y CD8+ de sangre periférica.

Polprasert *et al.* [9] detectaron mutaciones germinales en *HAVCR2* en casos de LTP esporádico, tanto asociados a SHF como no. En 10 casos se detectó una mutación homocigota p.Y82C; que también se ha detectado en casos de LTP familiar [8]. Otro caso fue positivo para p.Y82C y p.T101I, que estaban localizados en alelos independientes, resultando en una configuración heterocigota compuesta. Dos casos de LTP asociados a VIH y LES no mostraron esta mutación en su línea germinal. Estos hallazgos sugieren una mayor susceptibilidad a desarrollar LTP en aquellos individuos con esta mutación. Mediante análisis por secuenciación de exoma completo se detectaron 80 mutaciones somáticas en los 13 pacientes. Tres mutaciones (*AP2A1*, *DHX29* y *FADD*) se validaron mediante *amplicon-based deep sequencing*. Estas tres mutaciones se han encontrado también en el estudio de Li *et al.* [7].

Teniendo en cuenta estos estudios, Maliniemi *et al.* realizaron un estudio de microarrays de expresión génica en una cohorte de 20 pacientes con LTP. En este estudio, los genes sobrerregulados más comúnmente incluyeron *IFNG*, *CXCR3* y *CCL5* (que codifican proteínas involucradas en la promoción de un estado proinflamatorio a través del aumento de la respuesta de tipo Th1); así como la proteína IDO-1 (indolamina 2, 3-dioxigenasa) inducible por IFN γ . Curiosamente, IDO-1 se ha implicado en el desarrollo de la autoinmunidad, así como en la promoción de un entorno inmunosupresor que puede permitir la evasión de la vigilancia inmunitaria por las células tumorales [12]. La inmunotinción con IDO-1 y CXCR3 reveló patrones distintivos del LTP con respecto a LEP [12].

1.8. DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL DEL LTP

1.8.1. DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL CON PANICULITIS INFLAMATORIAS

Diagnóstico diferencial con paniculitis lúpica [75,76,60,77,54,55,64,78]

La paniculitis lúpica es una forma de presentación poco frecuente de lupus eritematoso cutáneo (2-3% de los casos). Fue descrita originalmente por Kaposi en 1883 [79], y posteriormente denominada “lupus eritematoso profundo de Kaposi-Irgang” por Arnold en 1956 [80].

Los criterios histopatológicos más útiles para distinguir LEP de LTP son la presencia en la paniculitis lúpica de afectación de la epidermis y la dermis, la existencia de folículos linfoides de células B con centros germinales reactivos, el infiltrado mixto con células plasmáticas prominentes, los grupos de células dendríticas plasmacitoides y el reordenamiento policlonal del gen TCR-gamma [36]. Los principales criterios diagnósticos de LEP se describen a continuación y se resumen en la Tabla 2.

a. Afectación de la unión dermo-epidérmica: Se ha descrito hasta en el 73% de los casos de LEP [62,60,54]. Con respecto al LTP puede presentar afectación de la interfase dermo-epidérmica hasta en la mitad de los casos [55,60] aunque esta suele ser focal [26].

b. Presencia de células plasmáticas: Las células plasmáticas suelen ser abundantes en el LEP [36,64]. Sin embargo, se ha descrito la presencia de estas células en algunos casos de LTP [19,60,54,55].

c. Presencia de folículos linfoides de células B: Es uno de los criterios clave para el diagnóstico diferencial de LEP y LTP [36,55,60].

d. Presencia de grupos de células dendríticas plasmacitoides: Es un criterio en favor de LEP [64], aunque se ha descrito su presencia hasta en el 36% de los casos de LTP [55].

e. Presencia de mucinosis intersticial: Es un criterio diagnóstico a favor de LEP [60]. Sin embargo algunos estudios sugieren que este criterio no es útil para distinguir entre LEP y LTP describiéndose en hasta el 95% de los casos de LTP [55].

f. Ausencia o moderada atipia celular: Si bien la presencia de atipia va a favor de LTP, algunos casos raros de LEP muestran rasgos de atipia citológica en el infiltrado [54], aunque suele ser moderada [60].

g. Reordenamiento policlonal TCR: Un reordenamiento policlonal de TCR apoya el diagnóstico de LEP. Sin embargo, algunos casos de LEP pueden presentar un reordenamiento monoclonal de TCR [4]. Por tanto, la detección de un reordenamiento monoclonal no es patognomónica de LTP [5].

Es importante recordar que ninguno de estos criterios es absolutamente específico ni puede utilizarse de forma aislada para apoyar uno u otro diagnóstico, sino que es necesario analizar en conjunto la constelación de los hallazgos clínicos, histológicos, inmunohistoquímicos y moleculares para establecer un diagnóstico correcto.

Diagnóstico diferencial con otras paniculitis inflamatorias

Además de la paniculitis lúpica, el diagnóstico diferencial del LTP incluye otras paniculitis lobulillares linfocitarias como la paniculitis por frío o las paniculitis asociadas a inmunodeficiencias (síndrome de Nemo, paniculitis lipoatróficas, síndrome H, etc.) [81–83]. La afectación dérmica, el inmunofenotipo del infiltrado y los estudios de reordenamiento junto a la correlación clínico-patológica suelen ayudar a establecer el diagnóstico diferencial entre el LTP y estas paniculitis.

TABLA 2. DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL DEL LINFOMA T PANICULÍTICO Y PANICULITIS LÚPICA

<i>Linfoma T paniculítico</i>	<i>Paniculitis lúpica</i>
Afectación predominantemente lobulillar	Afectación predominantemente lobulillar
Necrosis prominente (fibrinoide/coagulativa)	Necrosis prominente (hialina/lipomembranosa)
Polvo nuclear, cariorrexis, cambios degenerativos	Polvo nuclear, cariorrexis, cambios degenerativos
Exclusivamente subcutáneo Degeneración vacuolar de la capa basal rara	Afectación dérmica frecuente Afectación epidérmica. Degeneración vacuolar de la capa basal, atrofia epidérmica, engrosamiento de la membrana basal
<i>Rimming</i> de los adipocitos por los linfocitos atípicos	<i>Rimming</i> de los adipocitos por varios tipos de células
Linfocitos B escasos o ausentes	Nódulos de linfocitos B en la periferia de los lobulillos
Centros germinales ausentes	Centros germinales frecuentes
Células plasmáticas raras	Células plasmáticas frecuentes
Linfocitos monomorfos; grupos de células atípicas	Infiltrado mixto
Citofagocitosis	Ausencia de citofagocitosis
Ausencia de depósitos de calcio y mucina	Depósitos de calcio y mucina
Índice proliferativo elevado (Ki-67)	Índice proliferativo bajo (Ki-67)
Ausencia o pequeños grupos de células CD123+	Grupos de células CD123+
TCR: monoclonal	TCR: policlonal

1.8.2. DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL CON OTROS LINFOMAS

Es importante distinguir el linfoma T paniculítico de otros linfomas que afectan al tejido celular subcutáneo, tanto primarios como secundarios (Tabla 3) [25].

TABLA 3. DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL DE LINFOMA T PANICULÍTICO CON OTROS LINFOMAS, ADAPTADO DE LA CLASIFICACIÓN DE LA OMS 2016 [1].

Enfermedad	Clínica	CD3	CD4	CD8	PAGC ^a	CD56	$\alpha\beta$	$\gamma\delta$	EBV	Genes	Linaje
TCR											
LTP	Tumores (extremidades y tronco)	+	-	+	+	-	+	-	-	R	Célula T
LCT-GDCP	Tumores, placas, nódulos ulcerados	+	-	-/+	+	+	-	+	-	R	Célula T
LNKTE-tn	Nódulos, tumores	+	+/-	-/+	+	+/-	+/-	+/-	+	G	Célula NK, a veces célula T
LACG-CP	Nódulos superficiales con componente epidérmico	+	+	+/-	+/-	-	+/-	-/+	-	R	Célula T
MF	Parches, placas, tumores en fases avanzadas	+	+	-/+	-/+	-/+	+/-	-/+	-	R	Célula T
Neoplasia de CDP blásticas	Nódulos, tumores	-	+	-	-	+	-	-	-	G	Precursor de CDP

CDP: células dendríticas plasmacitoides; G: línea germinal; LACG-CP: linfoma anaplásico de células grandes cutáneo primario; LCT-GDCP: Linfoma de células T gamma delta cutáneo primario; LNKTE-tn: linfoma NK/T extranodal, tipo nasal; LTP: linfoma T paniculítico o linfoma de células T subcutáneo simulando paniculitis; MF: micosis fungoide; PAGC: proteínas asociadas a gránulos citotóxicos; R: reordenado; TCR (del inglés, T-cell receptor): receptor de células T;

^a Proteína(s) asociadas a gránulos citotóxicos TIA1, granzima B y/o perforina

^b Marcada variación en antígenos de célula T, incluyendo pérdida frecuente de antígenos de CD3, CD4 y CD8

Diagnóstico diferencial con micosis fungoide

El diagnóstico de micosis fungoide con afectación prominente del tejido celular subcutáneo solo puede realizarse con una correcta historia clínica, exploración física y correlación clínico-patológica. En este escenario la biopsia de todos los

tipos de lesiones (nódulos, parches, placas, alopecia, etc.) va a ser crucial para alcanzar el diagnóstico correcto.

Diagnóstico diferencial con linfoma anaplásico de célula grande subcutáneo

La afectación exclusiva del tejido celular subcutáneo, tal como ocurre en el LTP, es extremadamente rara en el LACG. La morfología de las células del LACG consiste en células pleomórficas de tamaño grande CD4 y CD30 positivas. La expresión de CD30 suele ser intensa y difusa en la membrana plasmática y en el aparato de Golgi en más del 75% de las células tumorales. Las células neoplásicas del LTP no suelen expresar CD30, aunque hay casos que puede mostrar una positividad menos llamativa.

Diagnóstico diferencial con linfoma NK/T extranodal, tipo nasal

En el LNKTE-tn suele haber una marcada afectación dérmica, con afectación epidérmica variable. La positividad de marcadores NK, CD56 y EBV y ausencia de reordenamiento de los genes TCR apoyan el diagnóstico.

Diagnostico diferencial con el linfoma de células T gamma-delta cutáneo primario

El diagnóstico diferencial de LTP con el LCT-GDCP es de especial relevancia, ya que este último tiene un pronóstico mucho peor con una supervivencia a los 5 años del 11% frente al 82% en el caso del LTP [19]. Además se ha propuesto que la afectación del tejido celular subcutáneo empeora el pronóstico [17,84,85]. Sin embargo, también se han descrito casos de LCT-GDCT con afectación extensa del tejido celular subcutáneo, lo que antiguamente se denominaba LTP-gamma/delta (*SPTCL-gamma/delta*), con un curso clínico indolente [14,86–97].

El LCT-GDCP puede mostrar características que simulan LTP (*rimming* de adipocitos por los linfocitos atípicos, citofagocitosis), pero generalmente afecta también a la dermis y la epidermis, y puede mostrar ulceración epidérmica [1]. En el LTP, las células neoplásicas expresan beta F1 y suelen ser CD56-, facilitando el diagnóstico diferencial con el LCT-GDCP [17,98]. Los principales criterios

diagnósticos para diferenciar LTP del LCT-GDCP se recogen en la Tabla 4. Por otro lado, también se han descrito casos de LCT-GDCP que simulan paniculitis lúpica [13,99].

TABLA 4. DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL DE LINFOMA T PANICULÍTICO Y LINFOMA DE CÉLULAS T GAMMA/DELTA CUTÁNEO PRIMARIO, ADAPTADO DE WILLEMZE ET AL [19].

	<i>Linfoma T paniculítico</i>	<i>Linfoma de células T gamma/delta cutáneo primario</i>
<i>Exploración física</i>	Nódulos o placas en piernas, brazos, tronco o cara	Nódulos o placas en piernas, brazos o tronco
<i>Síndrome hemofagocítico (SHF)</i>	Raro (20%)	Común (50%)
<i>Arquitectura</i>	Hipodermis +/- dermis profunda.	Hipodermis y/o dermis/epidermis. Infiltrado más monótono y difuso
<i>Epidermis</i>	Respetada	Células salpicadas en la capa basal hasta infiltrado liquenoide con necrosis de queratinocitos y ulceración
<i>Dermis</i>	Infiltrado perianexial en dermis profunda	Edema en dermis superficial
<i>Rimming</i>	Característico	Menos frecuente
<i>Histiocitos</i>	Característico	Frecuente
<i>Apoptosis y necrosis</i>	Característico	Frecuente
<i>Angiotropismo y angiodestrucción</i>	Raro	Común
<i>Asociación a enfermedad autoinmune</i>	20%	Más raro
<i>Inmunofenotipo</i>	TCR-beta, CD4-, CD8+, CD56-	TCR-gamma/delta, CD4-, CD8-, CD56-/+
<i>Supervivencia a los 5 años</i>	80%	10-20%
<i>Supervivencia a los 5 años sin SHF</i>	91%	-
<i>Supervivencia a los 5 años con SHF</i>	46%	-
<i>Tratamiento</i>	Corticoides sistémicos e inmunosupresores	Quimioterapia sistémica

1.9. PRONÓSTICO, FACTORES PREDICTIVOS Y TRATAMIENTO

La diseminación a los ganglios linfáticos y otros órganos es rara en pacientes con LTP [13,16,100]. La mediana de supervivencia a los 5 años es del 91%, aunque ante la presencia de un síndrome hemofagocítico asociado, el pronóstico empeora notablemente con un porcentaje de supervivencia a los 5 años de un 46% [19,62,101]. Tradicionalmente se ha empleado quimioterapia combinada [102]. Sin embargo, actualmente se opta por regímenes inmunosupresores más conservadores como primera línea de tratamiento [5,103–107].

Inmunomoduladores

Se preconiza el uso de inmunomoduladores como primera línea en el tratamiento del LTP, incluyendo corticoides sistémicos en monoterapia [5,108] o en combinación con ciclosporina [5,42,109] o metotrexato [5,110], incluso en pacientes con SHF confirmado [111]; así como en la enfermedad recidivante o resistente a la quimioterapia [8,112–117]. También se han empleado micofenolato mofetilo [118] y bexaroteno [119].

Quimioterapia

Clásicamente, el tratamiento del LTP se ha centrado en el uso de quimioterapia con múltiples agentes basados en antraciclinas, con una tasa de RC a largo plazo de alrededor del 30% [102]. Sin embargo, posteriormente, el refinamiento de los criterios de diagnóstico para LTP, así como la constatación de que el pronóstico es excelente a largo plazo, ha llevado a una reevaluación del papel de la quimioterapia en el tratamiento de esta enfermedad [19,42,120].

Radioterapia

La radioterapia se ha utilizado con buena respuesta en enfermedad unifocal o limitada [19,42,102,121].

Trasplante de progenitores hematopoyéticos

El papel y el momento del trasplante de progenitores hematopoyéticos (TPH) como tratamiento del LTP están mal definidos, con datos extraídos de casos

clínicos aislados y pequeñas series de casos [122–125]. Además, se describen pacientes que previamente habían recibido quimioterapia [117,126–129] o inhibidores de histona deacetilasa [124], en vez de terapias inmunosupresoras.

Otros tratamientos

Otros tratamientos empleados en el LTP con respuestas variables incluyen casos tratados con inhibidores de histona deacetilasa [130,131], denileukin diftitox [132], ruxolitinib (inhibidor de JAK1/JAK2) [133], anakinra (anti-IL1) y pralatrexate [134–136]. Ninguno de los casos estudiados de LTP mostró expresión de CCR4, la diana terapéutica de mogamulizumab [137].

1.10. PERSPECTIVAS, MEDICINA DE PRECISIÓN

Tras trece años de esfuerzos para secuenciar el genoma humano completo en el año 2003, la secuenciación del genoma de las enfermedades, en particular del cáncer, ha ido en aumento. Fue a partir de 2010, con la llegada de las plataformas de secuenciación de nueva generación (NGS) fácilmente accesibles a la comunidad académica, cuando comenzó la secuenciación del genoma del cáncer con un crecimiento exponencial [138]. Con el desarrollo de las técnicas de biología molecular y del uso de las herramientas bioinformáticas aplicadas, se han descubierto dianas moleculares involucradas en la patogénesis de los linfomas, en particular, y el desarrollo de fármacos diana específicos, permitiendo un tratamiento personalizado de los mismos. Esto es lo que se denomina “Medicina de precisión” y pretende lograr un aumento de la eficacia de los tratamientos, una disminución de los efectos secundarios en pacientes no respondedores y un menor coste económico.

1. 11. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LINFOMA T PANICULÍTICO

Los factores biológicos asociados a la respuesta clínica en el LTP han sido aún muy poco explorados. La heterogeneidad en el comportamiento biológico de estos pacientes, su similitud en muchos casos con la paniculitis lúpica y la alta

frecuencia en estos pacientes de enfermedades autoinmunes hacen de este linfoma un gran modelo tanto para el estudio del microambiente como para el estudio de posibles causas de susceptibilidad genética.

2. OBJETIVOS

1. Identificar firmas moleculares de expresión génica en linfoma T paniculítico, paniculitis lúpica y casos de solapamiento entre linfoma T paniculítico y paniculitis lúpica.
2. Caracterizar los casos de solapamiento histopatológico.
3. Correlacionar los datos de expresión génica con los datos clínicos.
4. Identificar marcadores que nos ayuden en la práctica diaria para establecer un diagnóstico diferencial entre linfoma T paniculítico y paniculitis lúpica.
5. Detectar posibles vías de señalización implicadas en la etiopatogenia del linfoma T paniculítico.
6. Identificar mutaciones y analizar su frecuencia en el linfoma T paniculítico.
7. Buscar posibles dianas terapéuticas.

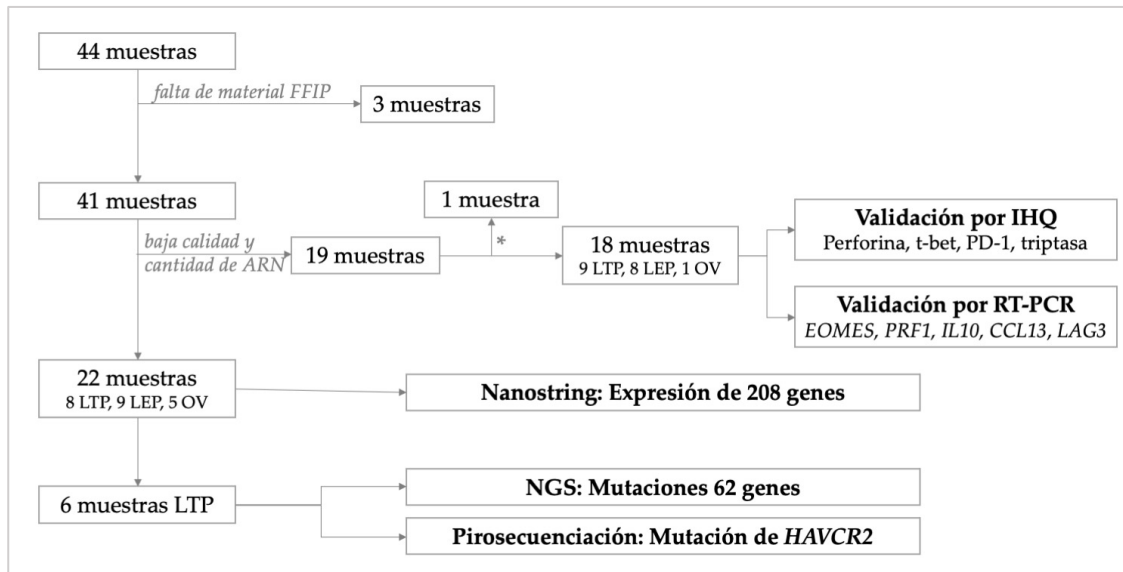
3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. MUESTRAS DE PACIENTES

Para este estudio se recolectaron 44 muestras que fueron obtenidas de los archivos de los centros colaboradores en España y Austria. Algunos de los casos fueron obtenidos del Registro Español de Linfomas Cutáneos (RELC) de la Academia Española de Dermatología y Venereología (AEDV) [139]. Tres casos fueron excluidos por falta de disponibilidad de material fijado en formol e incluido en parafina (FFIP). De los 41 casos restantes, 19 casos fueron excluidos del estudio de expresión de genes debido a la baja calidad y cantidad del ARN extraído. Finalmente, para el estudio de perfiles de expresión génica se utilizó una serie compuesta por 22 muestras (8 linfoma T paniculíticos [LTP], 5 casos de solapamiento [OV], 9 paniculitis lúpicas [LEP]) FFIP. En todos los casos, el diagnóstico de LTP se realizó de acuerdo con los criterios enumerados en la Clasificación de la OMS [1]. El diagnóstico de LEP se estableció según los criterios que aparecen en la Tabla 2. Los casos de solapamiento se definieron por la presencia de características histopatológicas de LTP (ribeteado de los adipocitos por linfocitos CD8 + atípicos con alto índice de proliferación) y características de LEP (dermatitis de interfase, mucina intersticial, linfocitos y células plasmáticas lobulillares, agregados linfoides de células B y grupos de células dendríticas plasmacitoides (CD123 +) en la misma biopsia o en muestras sucesivas [2,3]. Las muestras biológicas y datos clínicos de los pacientes incluidos en este estudio fueron recogidos, procesados y almacenados de acuerdo con los protocolos de calidad, seguridad y confidencialidad aprobado por los diferentes Biobancos de hospitales españoles. Su uso fue aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica de la Fundación Jiménez Díaz, FJD (Madrid) (Anexo). Para la validación de los estudios de expresión mediante IHQ y RT-PCR, se utilizaron 18 muestras adicionales FFIP (9 LTP, 8 LEP y 1 OV).

Se realizó estudio de las mutaciones en genes previamente publicados en la literatura con implicación pronóstica o etiopatogénica en linfomas T (panel customizado) mediante técnicas de NGS. El estudio se realizó en 6 de los casos de LTP con datos de expresión génica. El estudio mutacional del gen *HAVCR2* se realizó mediante pirosecuenciación (FIG. 1).

FIG. 1. ESQUEMA DE MUESTRAS DE PACIENTES Y TÉCNICAS EMPLEADAS.



FFIP: fijado en formol e incluido en parafina; LEP: lupus eritematoso profundo; LTP: linfoma T paniculítico; OV: caso de solapamiento; * Baja calidad de ADN.

3.2. EXTRACCIÓN DE ARN

El ARN total de biopsias de tejido FFIP se extrajo con el kit RNAeasy FFPE (Qiagen, Hilden, Alemania) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La calidad y la cantidad de los ARN se evaluaron con el kit RNA 6000 Nano (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EE. UU.) utilizando el bioanalizador Agilent 2100 BioanalyzerSystem (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EE. UU.).

3.3. ENSAYO DE EXPRESIÓN GÉNICA MEDIANTE NANOSTRING LST NCOUNTER

El perfil de expresión génica se realizó utilizando la tecnología de NanoString y un panel personalizado compuesto por 208 genes expresados en diferentes componentes del estroma y células neoplásicas, así como genes conocidos como

dianas terapéuticas en linfomas T; además, se incluyeron 8 sondas de genes constitutivos. El protocolo utilizado para el ensayo de expresión génica NanoString LST ha sido publicado previamente [140]. Se utilizaron 400 ng de ARN total, los cuales se hibridaron durante 16 h a 65 ° C. La eliminación automática del exceso de sonda y la inmovilización de los complejos sonda-transcripción en un cartucho recubierto con estreptavidina se llevaron a cabo en una estación de preparación nCounter. Los datos se analizaron utilizando nSolver™ Analysis Software versión 4.0 (NanoString Technologies, Seattle, WA, EE. UU.).

3.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando el lenguaje de programación R versión 3.5.2 (<https://www.R-project.org>, R Foundation for Statistical Computing, Viena, Austria) y el software de análisis estadístico GraphPad Prism 8.4.0 (San Diego, CA, EE.UU.).

Las variables categóricas se presentan como porcentajes y se analizan mediante regresión logística. Las variables continuas se presentan como mediana y rango. Las comparaciones entre los grupos, y las asociaciones entre los factores y el valor predictivo de las variables seleccionadas se evaluaron mediante la prueba *t* de Student. Para todos los análisis, los valores de $p < 0,05$ se consideraron estadísticamente significativos. Se aplicó el método Benjamini-Hochberg (BH) para la corrección de comparaciones múltiples (del inglés, *FDR adjusted p-value or q-value*). Se utilizó el software de análisis Morpheus (Broad Institute, Cambridge, MA, EE.UU.) para representar los mapas de calor agrupados.

3.4.1. ANÁLISIS DE ENRIQUECIMIENTO DE CONJUNTOS DE GENES

Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) (<http://www.broad.mit.edu/gsea>) es un método de cálculo que determina si, a priori, un conjunto predefinido de vías de señalización muestra diferencias estadísticamente significativas entre dos

estados biológicos. En esta Tesis Doctoral, el estudio de expresión génica se utilizó para identificar conjuntos de genes relacionados con LTP en comparación con LEP y, posteriormente, para comparara LEP y los casos de solapamiento. Para generar la base de datos de genes se utilizaron Biocarta (<http://www.biocarta.com>) y otras fuentes públicas disponibles a través de la base de datos de firma molecular (MSigDB: <http://www.broad.mit.edu/gsea/msigdb/index.jsp>), incluyendo aquellos más relevantes en la patogénesis de los linfomas y la respuesta inmune. El análisis se realizó con 1000 permutaciones. Se excluyeron los genes con más del 30% de los valores perdidos, y sólo se analizaron los conjuntos de genes que satisfacían los criterios de tamaño (mínimo 5, máximo 500 genes). Se consideraron significativas las vías de señalización con $p < 0.05$ y $FDR < 0.250$ [141].

3.5. ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO

Las muestras de LTP se tiñeron inmunohistoquímicamente con CD3, CD4, CD8, CD20, TCR beta, TCR gamma, Ki67, EBER y CD123 (Tabla 5).

TABLA 5. INMUNOTINCIONES DE LINFOMA T PANICULÍTICO

<i>Anticuerpo</i>	<i>Clon</i>	<i>Dilución</i>	<i>Fuente</i>
CD3	Conejo Monoclonal (Poly)	RTU	Dako-Agilent
CD4	Ratón Monoclonal (4B12)	RTU	Dako-Agilent
CD8	Ratón Monoclonal (C8/144B)	RTU	Dako-Agilent
CD123	Ratón Monoclonal (BSB-59)	1:30	Gennova
Ki-67	Ratón Monoclonal (MIB-1)	RTU	Dako-Agilent
TCR Beta	Ratón Monoclonal (8A3)	1:40	Gennetex

TCR Gamma	Ratón Monoclonal (H-41)	1:50	Santa Cruz
CD20	Ratón Monoclonal (L26)	RTU	Dako-Agilent
TIA	Ratón Monoclonal (Tia-1)	1:50	Gennova
EBER	EBER 1 DNP Probe está diseñado para unirse al RNA 1 codificado por el VEB (EBER 1)	RTU	Ventana-Roche

VEB, *Virus Epstein-Barr*

Para la validación de los estudios de expresión, se tiñeron dieciocho muestras adicionales FFIP (9 LTP, 8 LEP y 1 caso de solapamiento) mediante el método Endvision con un paso de recuperación de antígeno inducido por calor para PD-1, perforina, T-bet y triptasa (Tabla 6). Los casos se consideraron positivos cuando más del 5% de las células mostraron inmunorreactividad. La evaluación de todos estos marcadores se realizó por separado en células neoplásicas o acompañantes. El patrón de positividad también se describió en cada caso.

TABLA 6. INMUNOTINCIONES REALIZADAS PARA LA VALIDACIÓN

<i>Anticuerpo</i>	<i>Clon</i>	<i>Dilución</i>	<i>Fuente</i>	<i>Cut-off</i>
PD-1	Ratón Monoclonal (NAT-105)	1:2	CNIO	>10%
Perforina	Ratón Monoclonal (5B10)	1:50	Gennova	>10%
T-bet	Conejo Monoclonal (MRQ-46)	RTU	Ventana-Roche	>10%
Triptasa	Ratón Monoclonal (AA1)	RTU	Dako-Agilent	>10%

3.6. TRANSCRIPCIÓN INVERSA Y PCR CUANTITATIVA EN TIEMPO REAL

Para la síntesis de ADN complementario (ADNc), se utilizaron hexámeros aleatorios como cebadores y el ARN se retro-transcribió con el Transcription First-Strand cDNA Synthesis Kit (Roche Holding AG, Basilea, Suiza).

La amplificación de ADNc por PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR) se realizó en un sistema LightCycler 480 utilizando el kit LightCycler 480 SYBR Green I Master (Roche Holding AG, Basilea, Suiza) para *EOMES*, *PRF1*, *IL10*, *CCL13* y *LAG3*. El ciclo térmico para todos los genes se inició con un paso de desnaturalización a 95 ° C durante 10 minutos y luego se sometió a 45 ciclos de PCR (desnaturalización a 95°C durante 15 segundos, hibridación a 60°C durante 20 segundos y alargamiento a 72°C durante 10 segundos, en los que se adquirió la fluorescencia). Al final de los ciclos de PCR, se realizaron análisis de la curva de fusión, seguidos de secuenciación, para validar la generación del producto de PCR específico esperado. Los conjuntos de cebadores para *EOMES*, *PRF1*, *IL10*, *CCL13* y *LAG3* se recogen en la Tabla 7. La expresión génica relativa se calculó de acuerdo con el método de umbral de ciclo comparativo (Ct) [20]. La expresión de ATP5E se usó para la normalización y los resultados se representaron como niveles de expresión de ARNm relativos normalizados al control interno.

TABLA 7. SECUENCIA DE PARES DE CEBADORES Y CONDICIONES DE ARN MENSAJERO

GEN	Secuencia del cebador (5'-3')	TA(°C)
<i>EOMES.FW</i>	CCGCCACCAAACCTGAGATGATC	60
<i>EOMES.RV</i>	CCACAGGTCACCCATTGCGC	
<i>PRF1.FW</i>	CAGCAATGTGCATGTGTCTGTG	60.2
<i>PRF1.RV</i>	GAAGTCAGGGTGCAGCGG	
<i>IL10.FW</i>	GGATCAGCTGGACAACTTGTTG	61.3
<i>IL10.RV</i>	GTTCTCCCCCAGGGAGTTC	
<i>CCL13.FW</i>	GCTGAAGAGCTATGTGATCACC	61
<i>CCL13.RV</i>	GTGAGCTTTCCGGCCCG	
<i>LAG3.FW</i>	CTCAGAGCCTCCGACTGG	60
<i>LAG3.RV</i>	GCTGACTTGGGGCAGGAAG	
<i>ATP5E.FW</i>	CCGGCGTCTTGCGGATTC	60
<i>ATP5E.RV</i>	GATCTGGGAGTATCGGATG	

TA, temperatura de annealing; FW, cebador directo (del inglés, forward primer); RV, cebador inverso (del inglés, reverse primer).

3.7. EXTRACCIÓN DE ADN

Se aisló ADN de muestras diagnósticas de tejido FFIP. El ADN total se extrajo con kit de ADN truXTRAC FFPE (Covaris, Woburn, MA, EE. UU.) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La calidad y cantidad de ADN se evaluaron con el kit DNA 1000 ScreenTape (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EE. UU.) utilizando el bioanalizador Agilent 2100 BioanalyzerSystem (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EE. UU.).

3.8. PCR PARA EL REORDENAMIENTO DEL GEN TCR

El ADN genómico (ADNg) de muestras tumorales FFIP fue extraído utilizando el kit de preparación de muestras de ADN (Roche, Basilea, Suiza) de acuerdo con

el protocolo del fabricante. Los ADNs se cuantificaron con Qubit® (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE. UU.). Se realizó PCR para analizar la expansión clonal de células T mediante PCR para el reordenamiento del gen de la cadena TCR β (V β -J β y D β -J β) y TCR γ (V γ J γ) [142]. En todos los experimentos se incluyeron controles positivos y negativos apropiados. La clonalidad se evaluó siguiendo las recomendaciones convencionales [143].

3.9. SECUENCIACIÓN DIRIGIDA MEDIANTE NGS PARA EL ESTUDIO DE MUTACIONES

Para realizar la técnica de NGS, se utilizaron 50 ng de ADN genómico siguiendo las instrucciones del fabricante y un panel personalizado SureSelect de captura. Se utilizó la herramienta web SureDesign (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EE. UU.) (Earray.chem.agilent.com/suredesign/). Para diseñar los cebadores de 61 genes implicados en vías relevantes para la linfomagénesis (Tabla 8). Las secuencias exónicas de los genes seleccionados se extrajeron mediante el programa UCSC Genome Browser (<http://genome.ucsc.edu/>). Las coordenadas de las secuencias genómicas se basaron en el NCBI Build 37 (UCSC hg19). Las bibliotecas capturadas fueron secuenciadas en el equipo NextSeq500 (Illumina Inc., San Diego, CA, EE. UU.). La uniformidad en la cobertura es elevada, con más del 90% de las bases cubiertas con una profundidad de 500X.

Las lecturas obtenidas con el secuenciador se procesaron y analizaron con diferentes plataformas, las cuales llevan a cabo el análisis primario (conversión de la señal detectada a bases), secundario (transformación de las bases a alineamientos) y terciario (anotación de las variantes). Los análisis para la detección de variantes somáticas (SNVs, del inglés, *single nucleotide variants*) se realizaron para cada muestra siguiendo las mejores prácticas del flujo de trabajo GATK para la llamada de mutaciones somáticas, que implica la alineación de lecturas con Burrows-WheelerAligner (BWA, v-0.7.17) y SNV detección y filtrado por Mutect2 [144].

Las mutaciones somáticas relevantes se llamaron y filtraron excluyendo: (i) variantes solo presentes en lecturas unidireccionales; (ii) variantes con cobertura de <30X; (iii) variantes que ocurren en regiones genómicas repetitivas; (iv) variantes con frecuencia alélica variable (VAF) <1% en muestras tumorales; y (v) con una VAF > 45%; (vi) SNV en regiones reguladoras intrónicas, aguas abajo, aguas arriba; (vii) SNV con una frecuencia de alelos menores (MAF) > 1%. Las variantes detectadas fueron revisadas manualmente. Los archivos BAM (BinaryAlignmentMap) fueron visualizados utilizando el programa IntegratedGenomeViewer (IGV v.2.3; BroadInstitute). Además, fueron chequeadas con las bases de datos ClinVar, cBioPortal y COSMIC (catálogo de mutaciones somáticas en cáncer) para identificar posibles cambios patogénicos.

TABLA 8. LISTA DE GENES INCLUIDOS EN EL PANEL CUTOMIZADO SURESELECT

<i>ARHGEF3</i>	<i>CXCL12</i>	<i>MAPK1</i>	<i>SMARCA4</i>
<i>ARID1A</i>	<i>DDX3X</i>	<i>MTOR</i>	<i>SMARCB1</i>
<i>ARID1B</i>	<i>DNMT3A</i>	<i>NCOR1</i>	<i>STAT3</i>
<i>ATM</i>	<i>EFHC1</i>	<i>NOTCH1</i>	<i>STAT5B</i>
<i>B2M</i>	<i>EZH2</i>	<i>NRAS</i>	<i>SYK</i>
<i>BCOR</i>	<i>FOXM1</i>	<i>PD-L1</i>	<i>TET2</i>
<i>BRAF</i>	<i>FYN</i>	<i>PLCG1</i>	<i>TNFAIP3</i>
<i>CARD11</i>	<i>HRAS</i>	<i>PRDM1 (EXON 1)</i>	<i>TNFRSF1B</i>
<i>CCR4</i>	<i>ICOS</i>	<i>PRDM1 (EXON 7)</i>	<i>TP53</i>
<i>CCR7</i>	<i>IDH2</i>	<i>PRKCB</i>	<i>TRAF1</i>
<i>CD28</i>	<i>IRF4</i>	<i>PRKCQ</i>	<i>TRRAP</i>
<i>CD58</i>	<i>JAK1</i>	<i>PTPRN2</i>	<i>TSC1</i>
<i>CDKN2A</i>	<i>JAK2</i>	<i>RARA</i>	<i>VAV1</i>
<i>CDKN2B</i>	<i>JAK3</i>	<i>RHOA</i>	<i>ZEB1</i>
<i>CSNK1A1</i>	<i>KRAS</i>	<i>RLTPR</i>	
<i>CTLA4</i>	<i>LCK</i>	<i>SIK3</i>	

3.10. ESTUDIO DE PIROSECUENCIACIÓN DEL GEN *HAVCR2*

La PCR se realizó con 50 ng de ADN_g, 0,2 µM de cada cebador, 5 U / µl de polimerasa FastStartTaq (Roche), 1x Buffer con Mg²⁺ + a una concentración final de 2 mM, dNTP a una concentración final de 0,2 mM y agua estéril libre de nucleasas hasta un volumen de reacción final de 20 µl. Las condiciones de PCR

fueron 10 min de incubación inicial a 95 ° C, seguido de 45 ciclos de 95 ° C durante 10 s y 60 ° C durante 30 s.

Los productos de PCR se visualizaron en D1000 ScreenTape® (TapeStation DNA ScreenTape, Agilent Technologies) para evaluar el éxito y la especificidad de la PCR, y el tamaño adecuado del producto resultante (155 pb).

Se utilizaron cebadores de pirosecuenciación (FW.SEQ.01. [82-89], FW.SEQ.01. [97-101]) a una concentración final de 0,3 µM en tampón de hibridación. El orden de dispensación de nucleótidos (NDO, del inglés *nucleotide dispensation order*) de cada ensayo se optimizó para obtener el mejor resultado en el estudio de cada mutación, según la secuencia a analizar (Fig. 2). Los datos fueron analizados mediante el software Pyromark (Qiagen).

Los productos de PCR se procesaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante antes del ensayo de pirosecuenciación en un instrumento PyroMark Q24 (Qiagen). Examinamos el estado mutacional de *HAVCR2* para diferentes codones: 82 (Y82C), 83 (W83G / R), 85 (N85I), 88 (F88I), 89 (R89G / C / H / L), 97 (I97T / M), 98 (E98 / G), 99 (N99S), 101 (T101P / I) [GenBank: NG_030444.1, NM_032782.3, NP_116171.3], en 33 muestras de tumor FFPE mediante ensayo de pirosecuenciación con los cebadores específicos indicados en la Tabla 9.

FIG. 2. SECUENCIAS DE CEBADORES USADOS PARA AMPLIFICACIÓN DE PCR Y PIROSECUENCIACIÓN PARA LA DETERMINACIÓN DEL ESTADO MUTACIONAL DE *HAVCR2* (LONGITUD DEL AMPLICON = 155 P.B.).

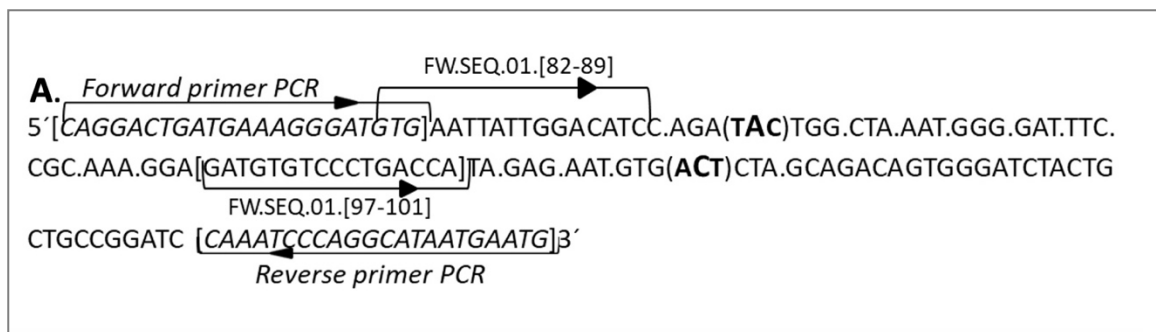


TABLA 9. ENSAYO DE PIROSECUENCIACIÓN DE HAVCR2 Y82-R89.

	WT	MUT	Dispensación alterada		Cambio de aa	Cambio de transcripción NM_032782.5	Cambio de proteína NP_116171.3	dbSNP
	TAC	TGC	↓A8	↑G9	C	c.245A>G	p.Tyr82Cys	rs184868814
W83G	TGG	GGG	↓T11	↑G12	G	c.247T>G	p.Trp83Gly	rs754336008
W83R	TGG	CGG	↓T11	↓todos los nucleótidos dispensados desde la posición 11	R	c.247T>C	p.Trp83Arg	rs754336008
N85I	AAT	ATT	↓A16	↑T17	I	c.254A>T	p.Asn85Ile	rs376605513
F88I	TTC	ATC	↓T21	↓todos los nucleótidos dispensados desde la posición 21	I	c.262T>A	p.Phe88Ile	rs1287543382
R89G	CGC	GGC	↓C22	↑G24+G19:G24	G	c.265C>G	p.Arg89Gly	rs372946929
R89C	CGC	TGC	↓C22	↑T23	C	c.265C>T	p.Arg89Cys	rs372946929
R89H	CGC	CAC	↓G24↓C25	↑A26	H	c.266G>A	p.Arg89His	rs759158630
R89L	CGC	CTC	↓G24	↑T23	L	c.266G>T	p.Arg89Leu	rs759158630 ¹

aa, aminoácido; *dbSNP*, base de datos de polimorfismo de nucleótido simple (del inglés, database of single nucleotid polymorphism);

MUT, mutación; *WT*, tipo salvaje (del inglés, wild type)

4. RESULTADOS

4.1. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS

A continuación, se describen las características clínicas de cada uno de los grupos estudiados. Los hallazgos clínicos se resumen también en la Tabla 10.

4.1.1. *CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LOS CASOS DE LINFOMA T PANICULÍTICO*

De los ocho casos con LTP, siete eran mujeres y uno era hombre. La edad media en el momento del diagnóstico fue de 45 años (rango 23-69 años). Las lesiones cutáneas consistieron en placas o nódulos múltiples (5/8) o solitarios (3/8) que se localizaban en las extremidades superiores (4/8), las extremidades inferiores (2/8), el tronco (3/8) y la cara (1/8). Dos pacientes presentaron una enfermedad autoinmune (artritis reumatoide y esclerosis múltiple). Dos de nuestros pacientes con LTP presentaron SHF. Cinco pacientes fueron tratados con inmunomoduladores (prednisona \pm ciclosporina) y uno con poliquimioterapia. Un paciente falleció debido a otra enfermedad antes de que comenzara el tratamiento y otro paciente con SHF murió a causa del linfoma 18 meses después del diagnóstico. Los pacientes restantes estaban vivos con (3/8) o sin enfermedad (2/8) después de un tiempo de seguimiento de 6 a 86 meses.

TABLA 10. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE NUESTROS CASOS DE LINFOMA T PANICULÍTICO (LTP), PANNICULITIS LÚPICAS (LEP) Y LOS CASOS DE SOLAPAMIENTO (OV).

<i>Enfermedad</i>	<i>LTP</i>	<i>OV</i>	<i>LEP</i>
<i>Total de pacientes</i>	8	5	9
<i>Edad media, mediana (rango) años</i>	45, 42.5 (23-69)	25, 30 (11-36)	55.7, 56 (38-67)
<i>Sexo</i>			
<i>Mujer</i>	7	4	9
<i>Hombre</i>	1	1	0
<i>Exploración física</i>			
<i>Nódulos/placas</i>	8	5	8
<i>Ulceración</i>	0	0	3
<i>Lesión única</i>	3	0	2
<i>Lesiones múltiples</i>	5	5	6
<i>Localización</i>			
<i>Cara</i>	1	2	1
<i>Tronco</i>	3	2	2
<i>Extremidades superiores</i>	4	4	5
<i>Extremidades inferiores</i>	3	2	6
<i>Enfermedad autoinmune</i>	2*	0	4**
<i>SHF</i>	2	0	1
<i>Tratamiento</i>			
<i>Prednisona</i>	1	3	7
<i>Ciclosporina</i>	2	0	0
<i>Metotrexato</i>	0	1	2
<i>Bexaroteno</i>	1	0	0
<i>Poliquimioterapia</i>	1	1	0
<i>Radioterapia</i>	0	1	0
<i>Antimaláricos</i>	0	3	6
<i>TPH</i>	0	1	0
<i>Ningún tratamiento</i>	1	0	0
<i>Otro tratamiento</i>	0	0	2
<i>Estado en el último momento de seguimiento</i>			
<i>Vivo sin enfermedad</i>	3	3	1
<i>Vivo con enfermedad</i>	3	2	6
<i>Fallecido por linfoma</i>	1	na	na
<i>Fallecido por otro motivo</i>	1	0	1
<i>Media de tiempo de seguimiento (rango) meses</i>	31 (6-86)	74 (12-146)	104 (23-217)

*artritis reumatoide, esclerosis múltiple; **lupus eritematoso sistémico (LES), síndromes de solapamiento (LES + Síndrome de Sjögren, esclerodermia o dermatomiositis); SHF, síndrome hemofagocítico; TPH, trasplante de progenitores hematopoyéticos; na, no aplicable.

Si nos centramos en los 6 casos de LTP que se utilizaron para el estudio mutacional, las lesiones consistían en placas o nódulos localizados en las extremidades inferiores (3/6), las extremidades superiores (3/6), la cara (1/6) y / o el tronco (2/6). Tres pacientes fueron tratados con inmunomoduladores, dos con quimioterapia y un paciente falleció antes de recibir el tratamiento. Se observaron niveles elevados de LDH y citopenia en 4 y 2 pacientes, respectivamente. Ninguno de nuestros casos presentó SHF. Excluyendo al paciente que falleció por otra enfermedad antes del tratamiento, todos los pacientes estaban vivos con (2/6) o sin (3/6) enfermedad en el último momento de seguimiento entre 1 y 10 años.

4.1.2. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LOS CASOS DE PANICULITIS LÚPICA

Se analizaron nueve casos de LEP, todos de sexo femenino. La edad media en el momento del diagnóstico fue de 55,7 años (rango 38-67 años). No se dispuso de otros datos clínicos de uno de los casos. Solo un caso de LEP asociado a LES presentó SHF. Las lesiones cutáneas consistían en placas o nódulos múltiples (6/8) o solitarios (2/8), que se ulceraron en tres casos. Se localizaban en las extremidades inferiores (6/8), las extremidades superiores (5/8), el tronco (2/8) y la cara (1/8). Cuatro pacientes cumplieron los criterios de diagnóstico de LES, o tenía características de solapamiento con síndrome de Sjögren, esclerodermia o dermatomiositis.

Los pacientes recibieron tratamiento mayoritariamente con prednisona y/o antimaláricos (6/8). Un paciente recibió tratamiento adicional con metotrexato y otro con leflunomida, inmunoglobulinas intravenosas, azatioprina, tacrolimus, belimumab, sulfona y talidomida, falleciendo a los 96 meses de seguimiento. Todos los demás pacientes con LEP estaban vivos, con

(6/8) o sin enfermedad (2/8), en su último seguimiento (rango 23-217 meses) antes de que se recopilaran los datos para este estudio.

4.1.3. *CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LOS CASOS DE SOLAPAMIENTO*

Cinco de los casos presentaron características histopatológicas superpuestas de LEP y LTP, cuatro mujeres y un hombre. La edad media en el momento del diagnóstico fue de 24,8 años (rango 11-36 años). Las lesiones cutáneas consistían en placas o nódulos múltiples localizados en los brazos (3/5), tronco (2/5), cara (2/5) y extremidades inferiores (1/5). Ninguno de los casos de solapamiento presentaba SHF ni se asociaba a enfermedades autoinmunes sistémicas. Los tratamientos administrados incluyeron corticosteroides, metotrexato, antipalúdicos y autotrasplante de progenitores hematopoyéticos. Todos los pacientes lograron una respuesta completa o parcial. Todos los pacientes estaban vivos, con o sin enfermedad, después de 12 a 146 meses de seguimiento.

4.2. *CARACTERÍSTICAS INMUNOHISTOQUÍMICAS, HIBRIDACIÓN IN SITU Y PCR TCR*

4.3.1. *CARACTERÍSTICAS INMUNOHISTOQUÍMICAS, HIBRIDACIÓN IN SITU Y PCR TCR DE LOS LINFOMAS T PANICULÍTICOS*

En la Tabla 11 se muestra la expresión de los anticuerpos estudiados mediante inmunohistoquímica. Todos los casos eran positivos para CD3, CD8 y TCR-beta. Granzima B y perforina fueron positivos en todos los casos estudiados, aunque TIA-1 mostró positividad en solo 5/8 de los casos. El índice proliferativo de las células neoplásicas era elevado y se encontraba entre el 60 y el 80%. Todos los casos fueron negativos para CD4, CD20, TCR-gamma, CD123 y EBER en los casos estudiados.

De los casos estudiados, 3/4 casos mostraron reordenamiento clonal para el gen TCR.

TABLA 11. CARACTERÍSTICAS INMUNOFENOTÍPICAS Y PCR TCR DE LOS CASOS DE LINFOMA T PANICULÍTICO

<i>Caso</i>	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	<i>5</i>	<i>6</i>	<i>7</i>	<i>8</i>
CD3	+	+	+	+	+	+	+	+
CD4	-	-	-	-	-	-	-	-
CD8	+	+	+	+	+	+	+	+
CD20	-	-	-	-	-	-	-	-
CD123	nd	nd	nd	-	nd	-	nd	nd
TCR beta	+	+	+	+	+	+/-	+	+
TCR gamma	-	-	-	-	-	-	-	-
Ki67	80%	60%	70%	70%	70%	nd	75%	80%
Perforina	+	+	+	nd	+	nd	+	+
Granzima B	+	+	+	+	+	+	+	+
TIA-1	-	+/-	+	+	+/-	+	-	-
EBER	-	-	-	+ *	-	-	-	-
PCR TCRβ	nv	nv	m	nv	p	nv	m	m

m, monoclonal; nd, no disponible; nv, no valorable; p, policlonal.

**células acompañantes*

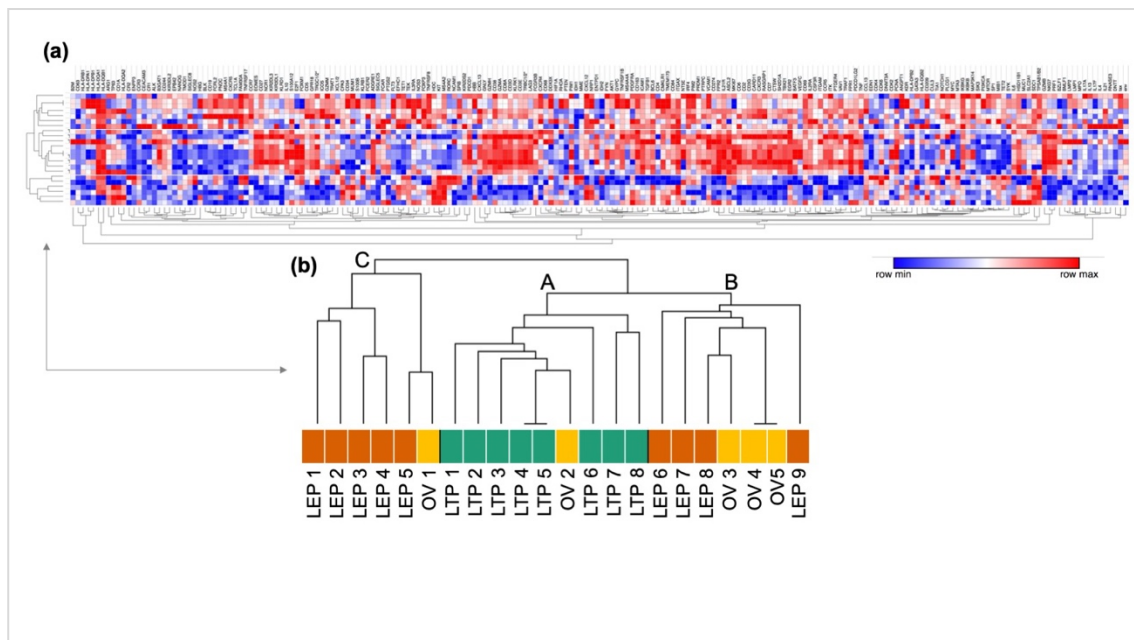
4.3. CARACTERÍSTICAS MOLECULARES

4.3.1. FIRMA MOLECULAR DE EXPRESIÓN GÉNICA

Decidimos analizar el perfil de expresión génica comparando muestras de LTP, LEP y casos de solapamiento procedentes de tejido FFIP. En primer lugar, se realizó un análisis no supervisado incluyendo todos los casos incluidos en la serie de estudio. En la Fig. 3, se muestra el análisis jerárquico no supervisado. En el dendograma, se observó un agrupamiento en la misma rama (A) de todos los

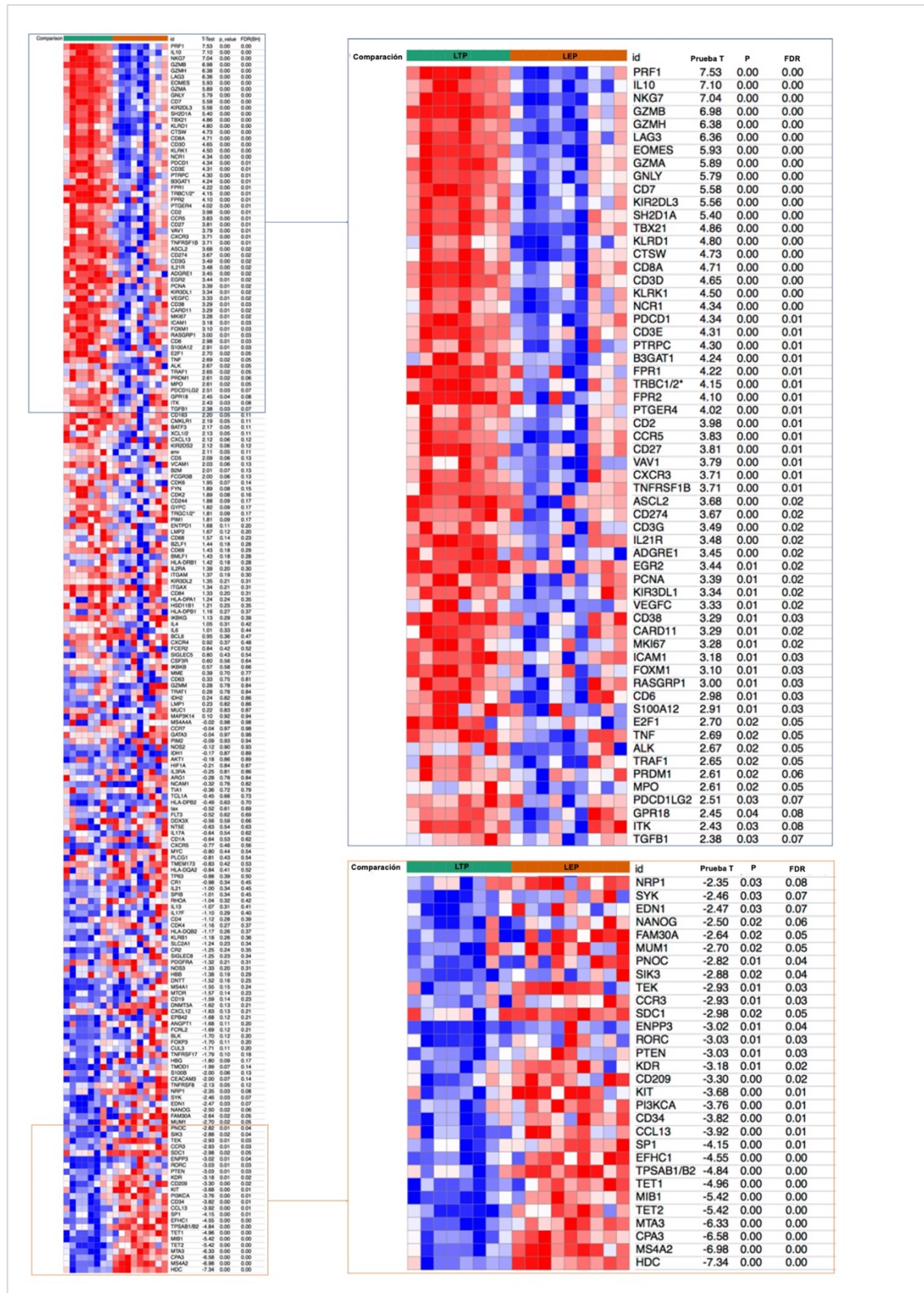
casos de LTP, mientras que los casos de LEP se agruparon en dos grupos, uno independiente (C) y otro más cercano molecularmente a los casos de LTP (B). Cuatro de los cinco casos de solapamiento se agruparon con los casos de LEP y el quinto caso se agrupó con los de LTP.

FIG. 3. A. MAPA DE COLOR DEL ANÁLISIS NO SUPERVISADO DE 22 MUESTRAS. CADA FILA CORRESPONDE A UNA MUESTRA DE TEJIDO, Y CADA COLUMNA CORRESPONDE A LA EXPRESION DE RNA DE UN GEN. B. DENDROGRAMA ASOCIADO AL HEATMAP DE (a) QUE MUESTRA EL AGRUPAMIENTO EN LA MISMA RAMA (A) DE TODOS LOS CASOS DE LTP (VERDE), AGRUPAMIENTO EN DOS GRUPOS DE LOS CASOS DE LEP (NARANJA), UNO INDEPENDIENTE (C) Y OTRO MÁS CERCANO A LOS CASOS DE LTP (B). CUATRO DE LOS CINCO CASOS DE SOLAPAMIENTO (OV, AMARILLO) SE AGRUPARON CON LOS CASOS DE LEP Y UN CASO SE AGRUPÓ CON LOS DE LTP.



Posteriormente, se realizó un análisis supervisado para comparar los casos de LTP con los casos de LEP, excluyendo los casos de solapamiento, y encontramos 90 GED. Se observaron 60 genes regulados al alza en el grupo de LTP, siendo los 10 genes más relevantes *PRF1*, *IL10*, *NKG7*, *GZMB*, *GZMH*, *LAG3*, *EOMES*, *GZMA*, *GNLY* y *CD7*. Por otro lado, en el grupo LEP fueron 30 los genes regulados al alza, siendo los 10 genes más relevantes *HDC*, *MS4A2*, *CPA3*, *MTA3*, *TET2*, *MIB1*, *TET1*, *TPSAB1/B2*, *EFHC1* y *SP1* (Fig. 4).

FIG. 4. MAPA DE COLOR DEL ANÁLISIS SUPERVISADO COMPARANDO EL LINFOMA T PANICULÍTICO (LTP, EN VERDE) Y EL LUPUS PANICULÍTICO (LEP, EN NARANJA) MOSTRANDO 60 GENES REGULADOS AL ALZA (CUADRO AZUL, ARRIBA A LA DERECHA) Y 30 GENES REGULADOS A LA BAJA (CUADRO NARANJA), ABAJO A LA DERECHA). CADA UNO DE LOS GENES REGULADOS AL ALZA APARECEN EN TONALIDADES DE ROJO Y LOS REGULADOS A LA BAJA EN TONALIDADES DE AZUL.



Los datos de expresión mediante GSEA, mostraron una expresión estadísticamente significativa ($p < 0,05$ y $FDR < 0,25$) de vías de señalización de células T citotóxicas y células T en las muestras de LTP con respecto al LEP (Tabla 12, Fig. 5). Por otro lado, en el grupo de LEP, fueron las vías relacionadas con las células B, PLC, NF- κ B, VEGF, mastocitos, p53, p53-hipoxia, CXCR4 y células dendríticas las enriquecidas estadísticamente (Tabla 13, Fig. 5).

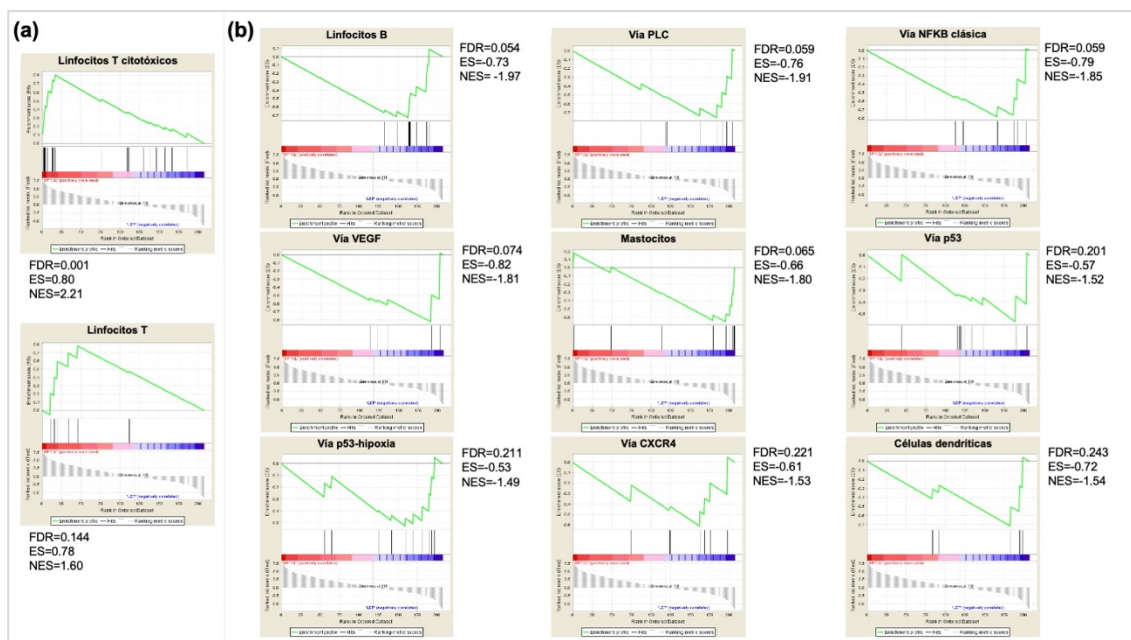
TABLA 12. GSEA. VÍAS DE SEÑALIZACIÓN EXPRESADAS EN LINFOMA T PANICULÍTICO

<i>Vías de señalización</i>	<i>Genes</i>
Células T citotóxicas	<i>PRF1, KLRD1, GZMA, NKG7, GZMB, KLRK1, GNLY, GZMH, CTSW</i>
Células T	<i>SH2D1A, CD3D, CD3E, CD3G, CD6</i>

TABLA 13. GSEA. VÍAS DE SEÑALIZACIÓN EXPRESADAS EN LUPUS PANICULÍTICO

<i>Vías de señalización</i>	<i>Genes</i>
Células B	<i>SDC1, FAM30A, PNOC, TNFRSF17, MS4A1, BLK, CD19, SPIB</i>
PLC	<i>MS4A2, PI3KCA, PTEN, SIK3, MTOR</i>
NF- κ B	<i>TET2, TET1, FAM30A, CEACAM3</i>
VEGF	<i>TET2, TET1, NT5E, IDH1</i>
Mastocitos	<i>CPA3, HDC, TPSAB1/B2, KIT, ENPP3</i>
p53	<i>MS4A2, SDC1, TP53</i>
p53-hipoxia	<i>PI3KA, KDR, SDC1, TEK, ANGPT1, PPGFRA</i>
CXCR4	<i>CD34, NANOG, CXCL12, MTOR</i>
Células dendríticas	<i>CCL13, CD209, EDN1</i>

FIG. 5. GSEA QUE MUESTRA QUE LAS VÍAS MÁS IMPORTANTE DEL LINFOMA T PANICULÍTICO SON AQUELLAS RELACIONADAS CON LAS CÉLULAS T CITOTÓXICAS Y LAS CÉLULAS T (A); Y AQUELLAS MÁS RELEVANTES EN LUPUS PANICULÍTICO SON AQUELLAS RELACIONADAS CON CÉLULAS B, PLC, NK-KAPPA BETA CLÁSICA, VEGF, P53, P53-HIPOXIA, CXCR4 Y CÉLULAS DENDRÍTICAS (B).

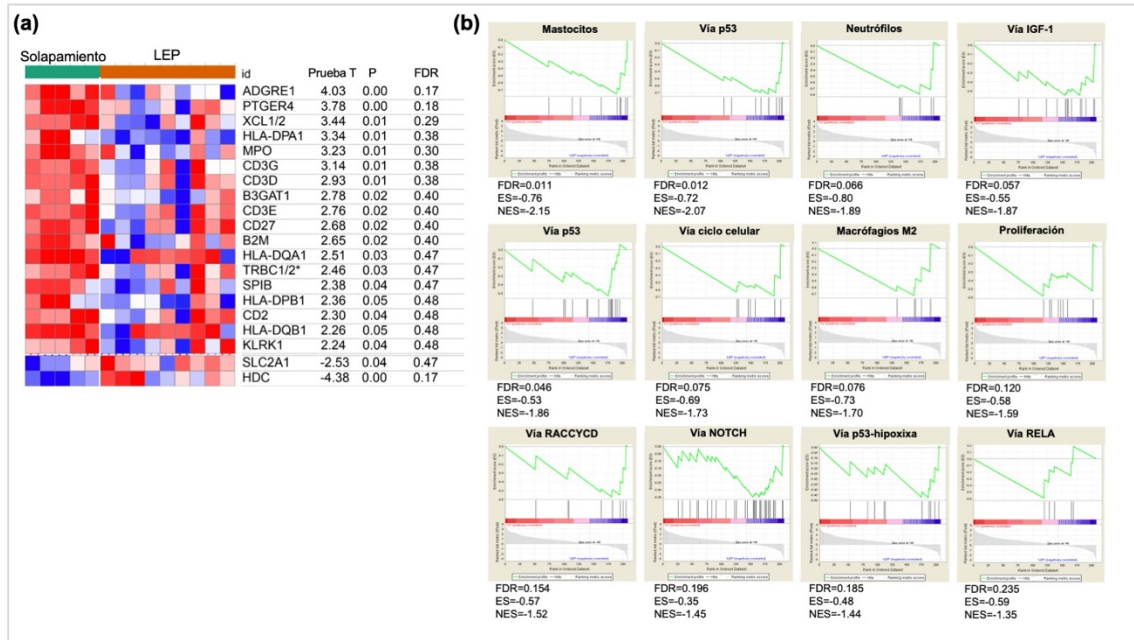


ES: enrichment score (puntaje de enriquecimiento); FDR: false discovery rate; NES: normalized enrichment score (puntaje de enriquecimiento normalizado).

Comparamos la expresión génica de los casos de solapamiento con aquellos casos diagnosticados de LEP y encontramos que 19 genes estaban sobreexpresados en los casos de solapamiento (*ADGRE1*, *PTGER4*, *XCL1/2*, *HLA-DPA1*, *MPO*, *CD3G*, *CD3D*, *B3GAT1*, *CD3E*, *CD27*, *B2M*, *HLA-DQA1*, *TRBC1/2*, *SPIB*, *CD2* y *KLRK1*), y dos genes estaban regulados a la baja (*HDC* y *SLC2A1*) con respecto a LEP (Fig. 6).

El análisis por GSEA no identificó vías relevantes en los casos de solapamiento con respecto a los casos de LEP. Sin embargo, sí que se encontraron vías relevantes en LEP: mastocitos, p53, neutrófilos, IGF1, G1, ciclo celular, M2, proliferación, *RACCYCD*, *NOTCH*, p53-hipoxia y *RELA* (Fig. 6, Tabla 14).

FIG. 6. A. MAPA DE COLOR COMPARANDO LOS CASOS DE SOLAPAMIENTO CON LOS CASOS DE LUPUS PANICULÍTICO (LEP) MOSTRANDO LOS GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESADOS ($P < 0,05$). B. GSEA MOSTRANDO LAS VÍAS MÁS RELEVANTES EN LEP CON RESPECTO A LOS CASOS DE SOLAPAMIENTO: MASTOCITOS, P53, NEUTRÓFILOS, IGF1, G1, CICLO CELULAR, M2, PROLIFERACIÓN, RACCYCD, NOTCH, P53-HIPOXIA Y RELA.



ES: enrichment score (puntaje de enriquecimiento); FDR: false discovery rate; NES: normalized enrichment score (puntaje de enriquecimiento normalizado).

TABLA 14. GSEA. VÍAS MÁS RELEVANTES EN LEP CON RESPECTO A LOS CASOS DE SOLAPAMIENTO

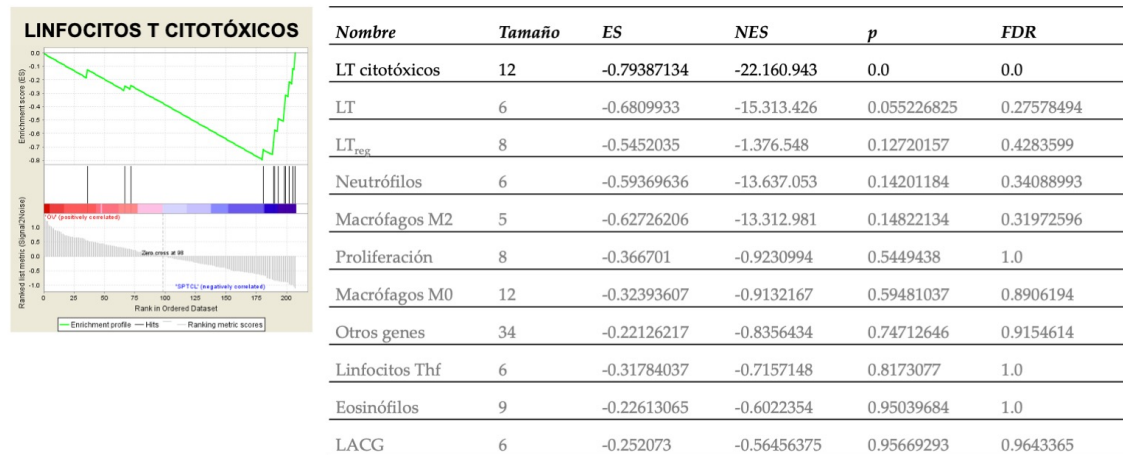
Vías de señalización	Genes
Mastocitos	HDC, CPA3, TPSAB1/B2, MS4A2, KIT
p53	SDC1, MUC1, TP53, MS4A2, GATA3, AKT1, FOM1
Neutrófilos	CEACAM3, FCAR, CSF3R, FCGR3B; S100A12, SIGLEC5
IGF1	SDC1, MUC1, KIT, CCR3, BZLF1, IL13, FOXM1, RNASE3, IL6, TNFRSF8
G1	MS4A2, CCR3, BZLF1, NT5E, RORC

Ciclo celular	<i>MIB1, MYC, PCNA, CDK2, MKI67, CDK4, CDK6</i>
Macrófago M2	<i>MYC, TGFB1, IL13, EGR2</i>
Proliferación	<i>MIB1, PCNA, CDK2, MKI67, DNTT, CDK4, CDK6, E2F1</i>
RACCYCD	<i>SDC1, TP63, MS4A2, GATA3</i>
NOTCH	<i>SLC2A1, SDC1, FCAR, MYC, KIT, IL17F, CCR3, BZLF1, RORC, TGFB1, EDN1, AKT1, TMOD1, IL13, FOXM1, RNASE3, IL6, IKBKB, TNFRSF8</i>
P53-hipoxia	<i>SDC1, PGFR4, MYC, HIF1A, TGFB1</i>
RELA	<i>AKT1, IL13, tax, ENPP3, env</i>

Al comparar los casos de solapamiento y las paniculitis lúpicas no hubo diferencias estadísticamente significativas en las otras vías analizadas mediante GSEA [MHC-II, RAC1, BLIMP-1, diferenciación de células T CD8, señalización de CD40 durante el desarrollo del centro germinal (CG), citotoxicidad, vía PI3K, dianas de Bcl6, genes de linfoma de células T, RHOA, señalización de citoquinas de células T, MHC-I, células CG-B, eosinófilos, monocitos, STAT3, TCR, células B, VEGF, MTOR, CG-T-célula colaboradora, GSK3, TGF- β vascular, homeobox, CXCR4, PLC, señalización de fosfatidilinositol, Toll, células T reguladoras, señalización de célula B y T, M0, firmeza, MAPK, CD, NF- κ B clásico].

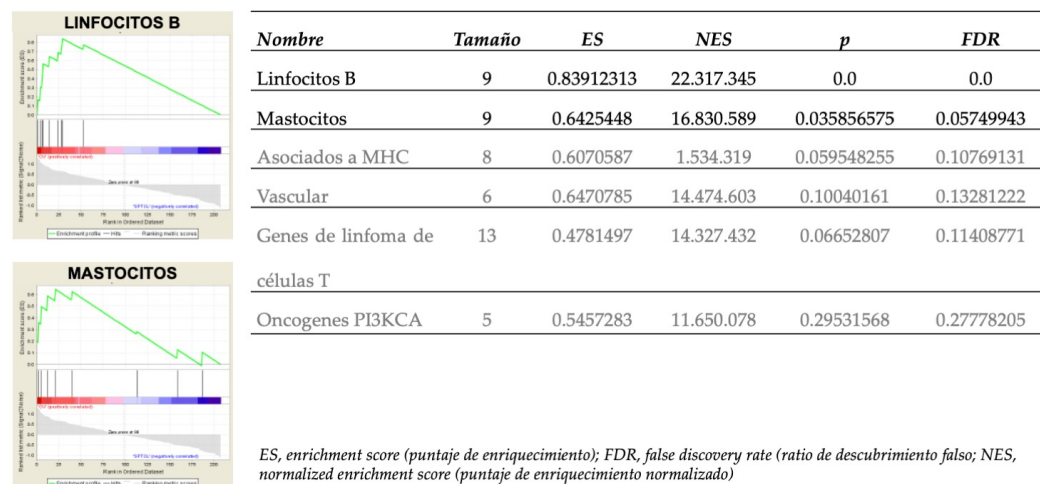
Mediante GSEA, las vías de señalización relacionadas con los linfocitos citotóxicos fueron relevantes en LTP con respecto a los casos de solapamiento (Fig. 7). En los casos de solapamiento, los linfocitos B y los mastocitos fueron relevantes en comparación con los linfomas T paniculíticos (Fig. 8).

FIG. 7. GSEA MOSTRANDO UN ENRIQUECIMIENTO DE LOS GENES RELACIONADOS CON LOS LINFOCITOS T CITOTÓXICOS EN LOS LINFOMAS T PANICULÍTICOS CON RESPECTO A LOS CASOS DE SOLAPAMIENTO DE FORMA SIGNIFICATIVA ($P < 0.05$).



ES, puntaje de enriquecimiento; FDR, tasa de descubrimiento falso; LACG, linfoma anaplásico de células grandes; LT, linfocitos T; LT_{reg}, linfocitos T reguladores; NES, puntaje de enriquecimiento normalizado; Thf, T helper foliculares.

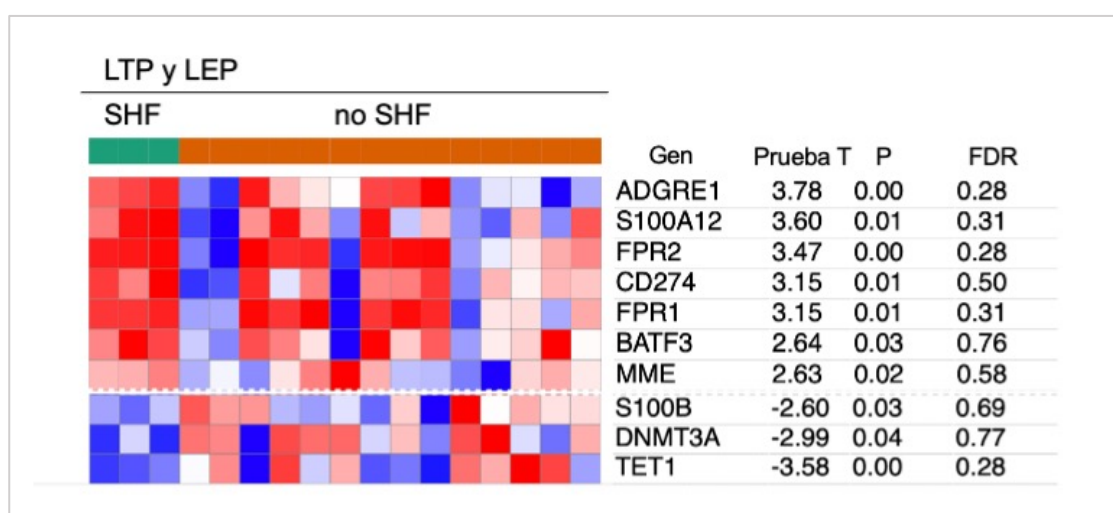
FIG. 8. GSEA DE LAS VÍAS MÁS RELEVANTES DE LOS CASOS DE SOLAPAMIENTO CON RESPECTO A LOS LTP.



ES, enrichment score (puntaje de enriquecimiento); FDR, false discovery rate (ratio de descubrimiento falso); NES, normalized enrichment score (puntaje de enriquecimiento normalizado)

Realizamos un análisis supervisado enfrentando los casos de LTP y LEP asociados a SHF y los casos que no presentan SHF. Observamos regulación al alza de *ADGRE1*, *S100A12*, *FPR2*, *CD274*, *FPR1*, *BATF3* y *MME*; y regulación a la baja de *TET1*, *DNMT3A* y *S100B* (Fig. 9).

FIG. 9. HEATMAP COMPARANDO LOS CASOS DE LTP Y LEP CON SHF (A, VERDE) FRENTE A LOS CASOS DE LTP Y LEP SIN SHF (B, NARANJA). LOS GENES SOBREENEXPRESADOS (EN ROJO) EN LOS CASOS ASOCIADOS A SÍNDROME HEMOFAGOCÍTICO (SHF) SON *ADGRE1*, *S100A12*, *FPR2*, *CD274*, *FPR1*, *BATF3* Y *MME*.

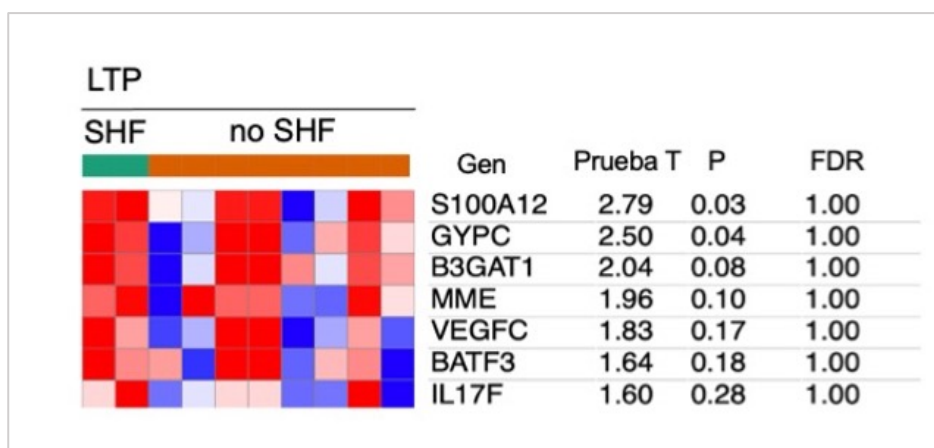


FDR, tasa de descubrimiento falso

Al centrarnos únicamente en los casos de LTP, *GYPC* y *S100A12* se sobreexpresaron en los casos de LTP con SHF en comparación con los casos de LTP sin SHF (Fig. 10).

No encontramos correlación de otros datos clínicos (asociación a enfermedad autoinmune o estado en el último momento de seguimiento) con los datos de expresión génica.

FIG. 10. MAPA DE COLOR MOSTRANDO QUE *S100A12* Y *GYPE* ESTÁN SOBREENEXPRESADOS EN LOS CASOS DE LTP CON SÍNDROME HEMOFAGOCÍTICO (A, VERDE) CON RESPECTO A LOS CASOS SIN SÍNDROME HEMOFAGOCÍTICO (B, NARANJA).

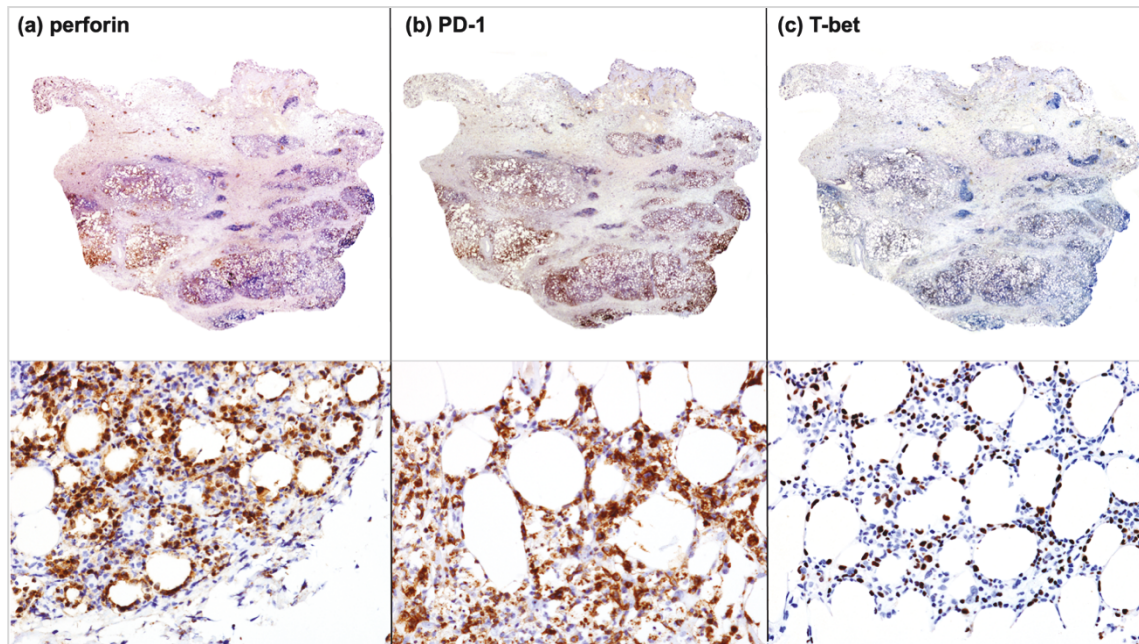


FDR, tasa de descubrimiento falso

Para validar los resultados encontrados en el perfil de expresión génica, decidimos caracterizar la expresión de PD-1, perforina y T-bet en muestras de pacientes con LTP. Para ello, realizamos estudio inmunohistoquímico en las muestras FFIP.

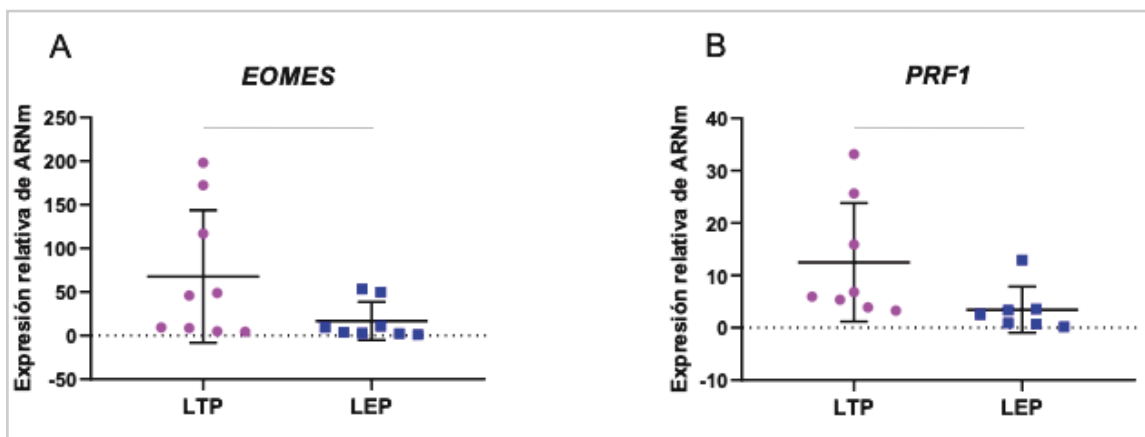
La mayoría de las células T neoplásicas bordeando los adipocitos mostraron una tinción intensa de los tres anticuerpos estudiados (Fig. 11). Sin embargo, se observó expresión de PD1 en linfocitos T colaboradores foliculares de centros germinales de casos de LEP; mientras que perforina y T-bet fueron positivos en las pocas células T encontradas en los septos y en aquellas localizadas en la dermis de LEP. La triptasa se encontró en ambas condiciones, principalmente en la dermis. Curiosamente, los mastocitos parecían mostrar una morfología alargada en los casos de LTP, mientras que en los LEP eran redondos.

FIG. 11. FIGURA REPRESENTATIVA DE LA EXPRESIÓN DE PERFORINA, PD-1 Y T-BET. A. TINCIÓN CON PERFORINA QUE MUESTRA POSITIVIDAD DEL INFILTRADO LOBULILLAR EN LA PANORÁMICA. A MAYOR DETALLE, PERFORINA TIÑE LAS CÉLULAS NEOPLÁSICAS QUE RODEAN A LOS ADIPOCITOS. B. POSITIVIDAD PARA PD-1 DEL INFILTRADO LOBULILLAR. NÓTESE EN EL DETALLE LA POSIVIDAD DE LAS CÉLULAS NEOPLÁSICAS QUE BORDEAN LOS ADIPOCITOS Y LAS CÉLULAS QUE SE HALLAN ENTRE LOS ADIPOCITOS. C. POSITIVIDAD DE T-BET DEL INFILTRADO LOBULILLAR. A MAYOR DETALLE, SE OBSERVA POSITIVIDAD DE LAS CÉLULAS NEOPLÁSICAS BORDEANDO A LOS ADIPOCITOS Y LAS CÉLULAS QUE SE ENCUENTRAN ENTRE LOS ADIPOCITOS.



Además, *PRF1* junto con *EOMES* fueron validados mediante RT-PCR (Fig. 12).

FIG. 12. A. ANÁLISIS MEDIANTE RT-PCR CUANTITATIVA DE LA EXPRESIÓN DE ARN MENSAJERO DE *EOMES* EN LAS MUESTRAS DE LINFOMA T PANICULÍTICO. B. ANÁLISIS MEDIANTE RT-PCR CUANTITATIVA DE LA EXPRESIÓN DE ARN MENSAJERO DE *PRF1* EN LAS MUESTRAS DE LINFOMA T PANICULÍTICO (* $P < 0.05$).



4.3.2. ESTUDIO MUTACIONAL

Como se comenta en el apartado de Material y Métodos, 6 casos de LTP fueron estudiados mediante la tecnología NGS, ya que permite estudiar diferentes genes en un número elevado de muestras. Cabe destacar que los 6 casos eran mujeres con una edad media en el momento del diagnóstico fue de 40,5 años; la mediana fue de 37,5 años.

Se generaron un total de 70.040.530 lecturas mapeadas y el 85.9% del total de bases se alinearon con el genoma humano completo (UCSC hg19, GRCh37, Febrero 2009). La cobertura media fue del 253X (rango: 34-602) para las muestras tumorales.

El estudio mutacional mediante la tecnología SureSelect reveló que un 83,3% (5/6) de los casos de LTP mostraron mutaciones (Fig. 13, Tabla 15). En la Fig. 14 se representa la localización de la mutación en relación con los dominios y la posición de los aminoácidos.

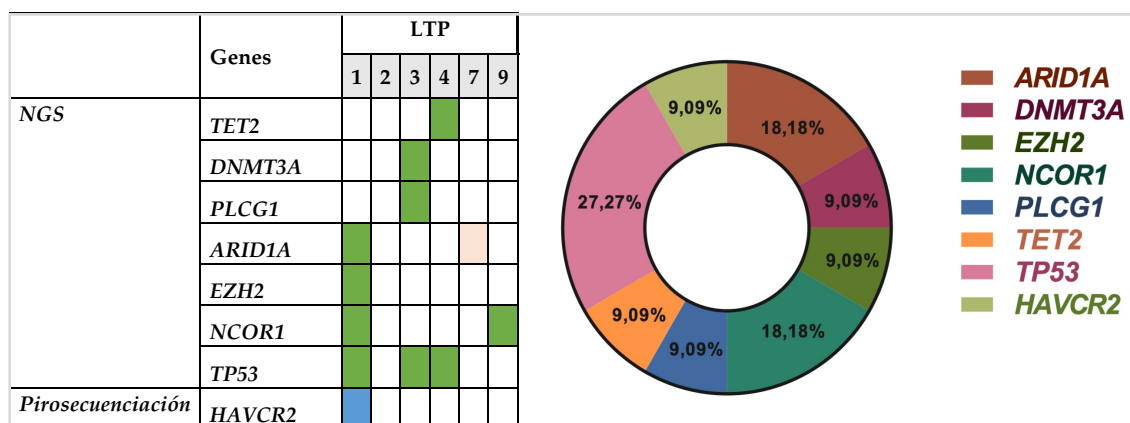
El gen *TP53* se encontró alterado en el dominio rico en prolina (PRD, del inglés *proline rich domain*) en el 50% de los casos (3/6), siendo la mutación más frecuente en nuestro estudio la Pro72Arg.

Con respecto a los genes relacionados con la remodelación de la cromatina (*TET2*, *DNMT3A*, *EZH2*, *ARID1A*, *NCOR1*), se encontraron mutaciones en un 66,7% (4/6) de los pacientes con LTP. Curiosamente, identificamos dos mutaciones diferentes del gen *ARID1A* (c.*25dup y c.1214A>C), un supresor de tumores relacionado con la epigenética, en dos pacientes distintos, siendo una de ellas una alteración localizada en la región 3'UTR (LTP7) y la otra, una mutación de terminación (Gln405Pro, FA 43,6%, LTP1). Este último paciente, también mostró la mutación *NCOR1*-Gly41Arg (FA <1%) que también se encontró en el LTP9 (FA 24,8%) (Tabla 15); *EZH2*-p.Gly5Val. El caso LTP3 presentaba mutaciones, en *DNMT3* (Tyr583Cys, p.Tyr546Cys y p.Tyr735Cys) y *PLCG1* (p.Ile813Thr).

Debido a que en el panel personalizado no estaba incluido el gen *HAVCR2*, decidimos recurrir a la tecnología de pirosecuenciación para estudiar el estado mutacional de este gen en nuestra serie de muestras. Solo uno de nuestros casos (LTP1) de los 6 casos estudiados (17%) mostró mutación de *HAVCR2* (Tyr82Cys) en homocigosis (Fig. 15). Se trataba de una mujer de 26 años con síntomas sistémicos sin SHF. Ningún caso de LEP mostró mutaciones en este gen.

Posteriormente tratamos de correlacionar los datos de mutaciones con los de expresión génica. Observamos que *TET2*, que estaba mutado en un caso, se expresaba a la baja de forma significativa en los LTP. Sin embargo, *PLCG1* y *DNMT3A*, aunque tenían una tendencia a regularse a la baja, en el caso mutado presentaban una expresión moderada.

FIG. 13. REPRESENTACIÓN DEL ESTADO MUTACIONAL DE NUESTROS CASOS DE LTP. EN EL CUADRO DE LA IZQUIERDO, EN VERDE, MUTACIONES MISSENSE, Y EN NARANJA, MUTACIÓN EN 3'UTR. EN AZUL, MUTACIÓN DE *HAVCR2* POR PIROSECUENCIACIÓN. A LA DERECHA DIAGRAMA EN ROSQUILLA DE LAS MUTACIONES ESTUDIADAS CON SUS RESPECTIVOS PORCENTAJES.



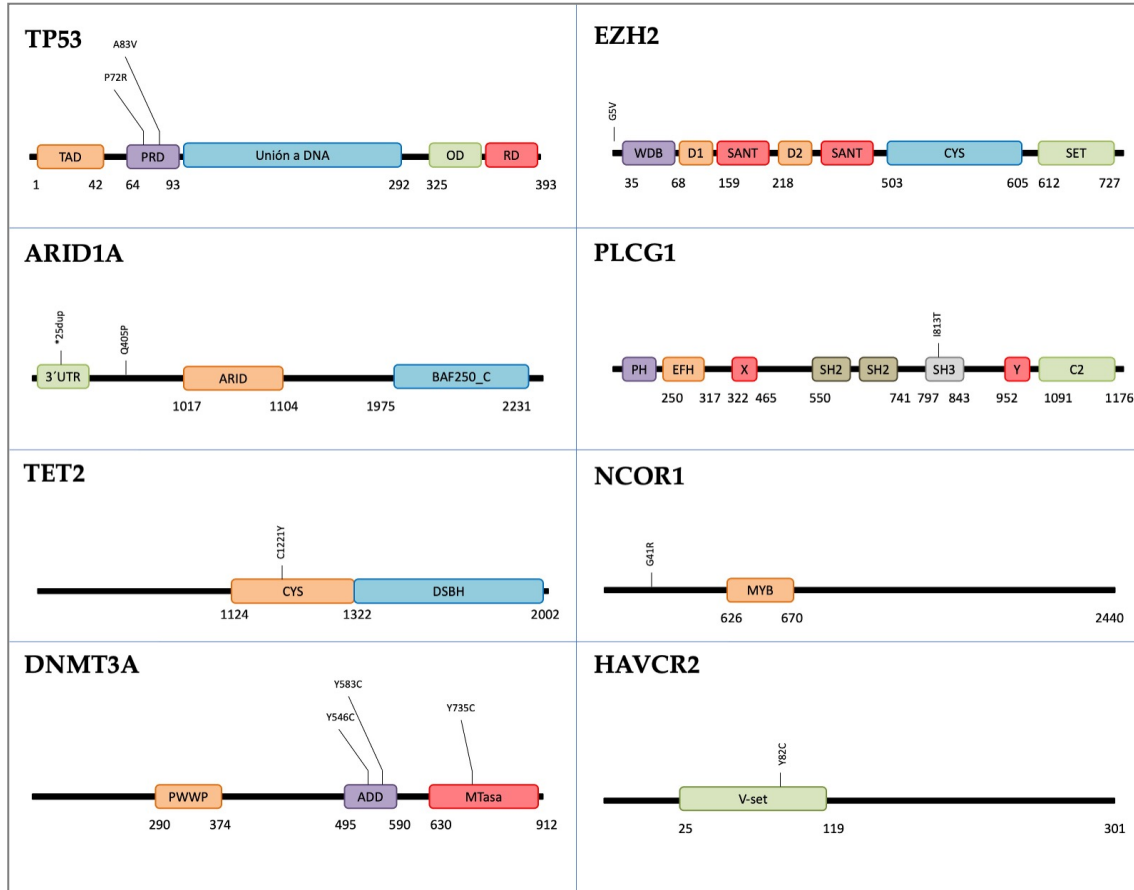
RESULTADOS

TABLA 15. CARACTERÍSTICAS DE LAS MUTACIONES ENCONTRADAS EN 5/6 MUESTRAS DE LTP ANALIZADAS MEDIANTE NGS Y PIROSECUENCIACIÓN*.

Caso	Gen	Locus	Base de referencia	Base alterada	Cambio de aminoácido	Cambio de ADN	Cobertura	FA (%)	Tipo de mutación	Efecto
1	ARID1A	chr1:27056218	A	C	p.Gln405Pro	c.1214A>C	57	43,6	nonsense	VSI
	EZH2	chr7:148544377	G	T	p.Gly5Val	c.14G>T	69	12,8	nonsense	VSI
	TP53	chr17:7579472	C	G	p.Pro72Arg	c.215C>G	34	<1	nonsense	Probablemente benigna (rs1042522)
	NCOR1	chr17:16068463	G	A	p.Gly41Arg	c.121G>A	116	<1	nonsense	VSI
	HAVCR2*	chr5:157106776	A	G	p.Tyr82Cys	c.245 ^a >G	na	na	missense	Factor de riesgo (rs184868814)
2	WT									
3	TP53	chr17:7579439	C	T	p.Ala83Val	c.248C>T	267	60,8	missense	Interpretación de patogenicidad conflictiva
	TP53	chr17:7579472	C	G	p.Pro72Arg	c.215C>G	267	59,9	missense	Probablemente benigna (rs1042522)
	PLCG1	chr20:39797465	T	C	p.Ile813Thr	c.2438T>C	355	99,7	missense	VSI
	DNMT3A	chr2:25463289	A	G	Tyr583Cys	c.1748A>G	602	<1	missense	VSI
	DNMT3A	chr2:25463289	A	G	p.Tyr546Cys	c.1637A>G	602	<1	missense	VSI
	DNMT3A	chr2:25463289	A	G	p.Tyr735Cys	c.2204A>G	602	<1	missense	Probablemente benigna
4	TET2	chr4:106164794	G	A	p.Cys1221Tyr	c.3662G>A	211	12	nonsense	VSI
	TP53	chr17:7579472	C	G	p.Pro72Arg	c.215C>G	112	61,9	nonsense	Probablemente benigna (rs1042522)
7	ARID1A	chr1:27107263	T	TC		c.*25dup	76	34,4	3'UTR	VSI
9	NCOR1	chr17:16068463	G	A	p.Gly41Arg	c.121G>A	182	24,8	nonsense	VSI

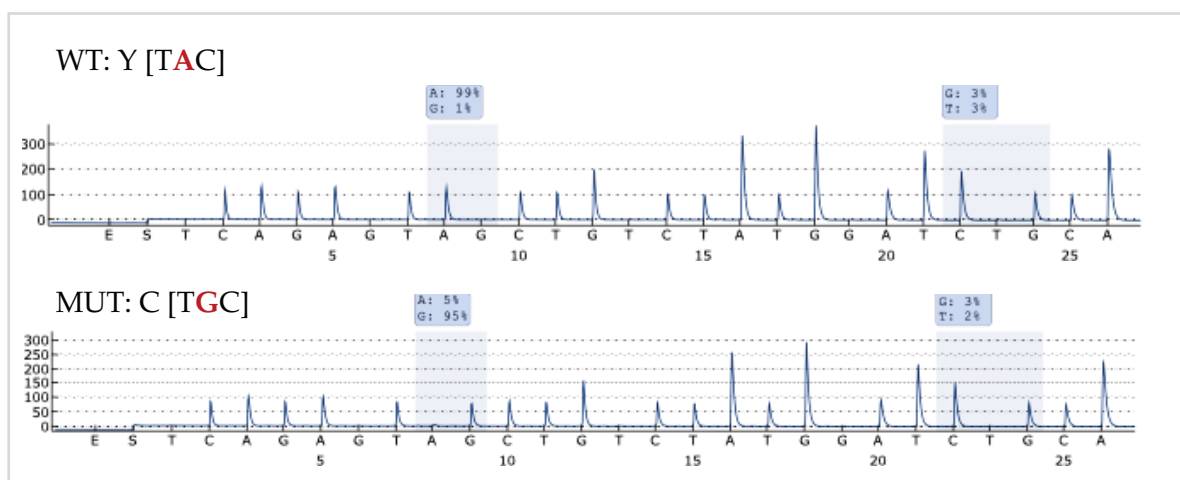
FA, frecuencia alélica; missense, del inglés, significa cambio de sentido; na, no aplicable; NGS, next generation sequencing, del inglés, secuenciación de nueva generación; nonsense, del inglés, significa sin sentido; VSI, variante de significado incierto, WT, wild type, tipo salvaje.

FIG. 14. MUTACIONES DETECTADAS POR NGS EN NUESTROS CASOS DE LINFOMA T PANICULÍTICO. SE REPRESENTAN LA LOCALIZACIÓN DE LA MUTACIÓN EN RELACIÓN CON LOS DOMINIOS Y LA POSICIÓN DE LOS AMINOÁCIDOS.



ADD, ATRX-DNMT3-DNMT3L; ARID, unión a ARID/BRIGHT; BAF250_C, subunidad BAF250/Osa del complejo SWI/SNF-like; CYS, dominio rico en cisteína; D2, unión a SUZ12; DSBH, hélice beta de doble lámina; EFH, motivo mano EF (del inglés, EF-hand motif); MYB, unión a Myb; MTasa, metiltransferasa; OD, dominio de oligomerización; PH, N-terminal; PRD, dominio rico en prolina (del inglés, proline rich domain); PWWP, dominio rico en prolina y triptófano; RD, dominio regulador; SANT, unión a EED o DNMTs; SET, dominio catalítico; SH2, homología al dominio 2 de la proteína src (del inglés, src homology 2); SH3, homología al dominio 2 de la proteína src (del inglés, src homology 3); TAD, dominio de transactivación; V-set, dominio inmunoglobulina V-set; WDB, unión a WD repeat (del inglés, WD repeat binding); X-Y, dominio catalítico de fosfolipasa C específica de fosfatidilinositol.

FIG. 15. ANÁLISIS MEDIANTE PIROSECUENCIACIÓN. SECUENCIA DE DNA DEL GEN HAVCR2 TIPO SALVAJE (ARRIBA) Y MUTACIÓN Y82C (ABAJO).



WT, tipo salvaje, MUT, mutado.

5. DISCUSIÓN

En este estudio hemos observado firmas moleculares distintivas en LTP y LEP. Sin embargo, un subgrupo de LEP compartía algunos genes que también eran expresados por LTP, lo que sugiere una posible base molecular común en estos casos. Desde el punto de vista molecular, los casos de solapamiento se parecían más a LEP (4 de 5) que a LTP, lo que podría indicar que la mayoría de los casos de solapamiento se comportan como LEP.

A continuación, vamos a discutir los principales hallazgos de nuestro estudio.

5.1. GENES SOBREEXPRESADOS EN LINFOMA T PANICULÍTICO

5.1.1. CITOTOXICIDAD COMO FIRMA MOLECULAR DEL LTP

Nuestro estudio demuestra una expresión al alza de los genes de citotoxicidad de las células T en LTP en comparación con LEP ($p < 0,01$), como era de esperar. Este hallazgo concuerda con los hallazgos de Maliniemi *et al.* [12], que demostraron la sobreexpresión de los genes *NKG7*, *PRF1*, *GZMB* y *KLRD1* en cuatro casos de LTP en comparación con tejido celular subcutáneo normal y eritema nudoso, utilizando *microarrays* de expresión génica. Cabe señalar que en estudios previos tanto de inmunohistoquímica como de perfiles de expresión génica de lupus eritematoso cutáneo (LEC), incluido el LEP [145], se ha demostrado una positividad intensa por inmunohistoquímica de marcadores de citotoxicidad y de genes relacionados con citotoxicidad, respectivamente [146–149], lo que hace que nuestros resultados tengan una relevancia aún mayor. En nuestro estudio, pudimos validar perforina mediante inmunotinción de las células neoplásicas que rodean a los adipocitos; así como mediante RT-PCR.

Por otro lado, los factores de transcripción T-box, T-bet y eomesodermina (EOMES), que son importantes reguladores de linfocitos citotóxicos [150], se sobreexpresaron en nuestros casos de LTP. Se ha propuesto que la

omesodermina es necesaria para la completa diferenciación efectora de las células T CD8+ [151], sobre todo a través de la inducción del gen citolítico de la perforina [152].

Un estudio reciente basado en perfiles de expresión génica de célula única, ha identificado y caracterizado las células malignas y los subconjuntos inmunes de un paciente con LTP. Las células malignas de LTP expresaban una firma genética distintiva, incluidas las proteínas citotóxicas (GNLY, GZMA, GZMK) [153].

5.1.2. RESPUESTA INMUNE TIPO 1 COMO FIRMA MOLECULAR DE LTP

En nuestro estudio se observó sobreexpresión de los genes *TBX21*, *CXCR3* y *CCR5* que se asocian con la respuesta inmunitaria de tipo 1. Además, mediante inmunotinción con el factor de transcripción T-bet (codificado por *TBX21*, y cuyo ligando es *CXCR3*) pudimos observar positividad de las células neoplásicas que rodean a los adipocitos (Fig. 11). En consonancia con estos hallazgos, un estudio anterior ha mostrado una regulación al alza de los genes de citocinas específicas de Th1 (*IFNG*, *CXCR3*, *CXCL9*, *CXCL10*, *CXCL11* y *CCL5*), en muestras de LTP [12]. En este último trabajo, las células malignas CD8 + que rodeaban a los adipocitos expresaron *CXCR3* (la diana transcripcional de *TBX21*). Cabe señalar que nuestro grupo comparativo consistió en un tipo de LE cutáneo caracterizado por el aumento de *CXCR3* [145] y de la respuesta inmune de tipo 1 [154].

TBX21 define el linaje que inicia el desarrollo de la respuesta Th1 a partir de células precursoras de Th *naïve*, tanto activando programas genéticos Th1 como reprimiendo los programas genéticos Th2 y Th17 opuestos [155]. Activa la transcripción de un conjunto de genes relacionados con Th1, incluidos los que codifican IFN- γ y el receptor de quimiocinas *CXCR3*. La expresión de T-bet se ha estudiado previamente en otros linfomas cutáneos de células T (LCCT) y se ha encontrado una expresión elevada de T-bet en estadios tempranos de MF (fase de parche y placa). Sin embargo, el estadio avanzado de MF (tumores), el SS y el

linfoma anaplásico de células grandes cutáneo primario fueron negativos para T-bet [156]. Con respecto al linfoma periférico de células T (PTCL, del inglés *peripheral T cell lymphoma*), se ha definido un subgrupo de PTCL-TBX21 de buen pronóstico que es positivo para la inmunotinciones T-bet y CXCR3 [157]; frente a un subgrupo PTCL-GATA3 (GATA3+, CCR4+) de peor pronóstico [158]. Además, la expresión inmunohistoquímica de marcadores citotóxicos (TIA-1 y / o granzima B) se ha asociado con más frecuencia con PTCL-TBX21 en comparación con PTCL-GATA3 (31% *vs* 5% y 54% *vs* 11%, respectivamente. Además de las diferencias inmunofenotípicas de estos PTCLs, también se han descrito diferencias en la morfología y en el microambiente de estos subtipos. Se ha visto que PTCL-GATA3 parece ser un grupo más uniforme, compuesto principalmente por células tumorales monomorfas con un microambiente inflamatorio escaso, predominantemente CD4+ y rara vez expresan marcadores citotóxicos. En cambio, PTCL-TBX21 es un grupo más heterogéneo con una mezcla de casos CD4+ y CD8+, y expresión variable de marcadores citotóxicos, a menudo con un patrón polimorfo de células neoplásicas intercaladas en un microambiente del tumor, incluido el patrón linfoepitelioide del conocido clásicamente como linfoma de Lennert. Por tanto, el LTP comparte con este último grupo, la expresión de TBX21, la expresión de marcadores citotóxicos y la presencia de un rico microambiente [158].

5.1.3. LAS CÉLULAS T CD8+ EXHAUSTAS Y LA SOBREENPRESIÓN DE LOS GENES RELACIONADOS EN LTP

Las células T CD8+ exhaustas o agotadas se identificaron por primera vez en infecciones virales crónicas. El agotamiento de las células T CD8+, ocurre en respuesta a la persistencia de la estimulación antigénica y a la ausencia de señales coestimuladoras de las células T CD4+. El agotamiento de las células T CD8+ se caracteriza por la pérdida de la función efectora, la expresión persistente de los receptores inhibidores y los cambios en la expresión de los genes que dan lugar

a una firma transcripcional distinta de la de las células T efectoras, de memoria y anérgicas [159].

LAG3, *PTGER4*, *TBX21*, *EOMES* y *PDCD1*, que se han asociado con el agotamiento de las células T CD8+, se sobreexpresaron en nuestro estudio. Este grupo de genes se ha estudiado anteriormente en otros LCCT (como MF y SS), y se demostró que su expresión estaba asociada a un estadio de la enfermedad más avanzado (T3 o T4) [160]. En cualquier caso, es posible que la expresión de un grupo de genes determinado tenga un papel biológico diferente en las células T neoplásicas CD4+ con respecto a las CD8+, como es nuestro caso.

PD-1 es un receptor inhibidor de las células T activadas por antígenos que desempeña un papel fundamental en la inducción y el mantenimiento de la autotolerancia inmunitaria [161]. Transmite señales inhibitorias al unirse a los ligandos CD274 / PDCD1L1 y CD273 / PDCD1LG2. *PD-1* y los genes de ambos ligandos se sobreexpresaron en nuestros casos de LTP. Inmunohistoquímicamente, PD-1 se expresó en los linfocitos neoplásicos que rodean los adipocitos de los casos de LTP. Solo hemos encontrado un estudio previo en el que se estudian 7 casos de LTP, de los cuales 4 fueron positivos para PD-1 [162].

Muchos de los genes relacionados con el linfocito T CD8+ exhausto son moléculas de puntos de control inmunológico de células T y se han visto sobreexpresadas en un caso de LTP, incluyendo *LAG3*, *CD27*, *TIGIT*, *HAVCR2*, *PDCD1* y *CTLA4* [153]. Además de *PDCD1*, en nuestro estudio también observamos sobreexpresión de *LAG3* y *CD27* (Fig. 4) aunque no pudimos validar *LAG3* mediante rt-PCR. La expresión génica de *TIGIT*, *HAVCR2* y *CTLA4* no fue evaluada en nuestro estudio.

5.1.4. SOBREEXPRESIÓN DE GENES RELACIONADOS CON PROLIFERACIÓN EN LTP

La tinción inmunohistoquímica con Ki67 que muestra un alto índice proliferativo de las células neoplásicas que bordean los adipocitos en el LTP es uno de los criterios bien establecidos del diagnóstico diferencial con LEP [54]. Esto concuerda con nuestros hallazgos, ya que *MKI67* se expresó diferencialmente en LTP. Otros genes relacionados con la proliferación, como el *PCNA*, *FOXM1* y *E2F1*, también se expresaron diferencialmente en LTP.

5.2. GENES SOBREEXPRESADOS EN PANICULITIS LÚPICA

Lo que confiere un interés especial a este estudio es el grupo comparativo, formado por muestras de LEP que, a su vez, constituye el principal diagnóstico diferencial de LTP en la práctica clínica habitual. A continuación, vamos a discutir los grupos de genes sobreexpresados en las paniculitis lúpicas.

5.2.1. SOBREEXPRESIÓN DE GENES DE LINFOCITOS B Y CÉLULAS PLASMÁTICAS EN LEP

En nuestro estudio, observamos una expresión génica distintiva de LEP que incluye la firma de células B (*PNOC*, *KDR*, *FAM30A*) y la firma de células plasmáticas (*SDC1* (*CD138*)) tal como se ha descrito en observaciones previas que comparan muestras de LEC crónico comparadas con piel normal[163]. Estos hallazgos están en línea con los de las técnicas de inmunohistoquímica convencionales que identifican las células plasmáticas (CD138+) y los agregados de células B (CD20+) como hallazgos que apoyan el diagnóstico histopatológico de LEP.

5.2.2. SOBREEXPRESIÓN DE GENES RELACIONADOS CON LOS MASTOCITOS EN LEP

La sobreexpresión de genes implicados en las vías de los mastocitos en nuestro estudio pone de relieve un posible papel de estas células en la patogénesis de la LEP, que ha sido poco estudiada hasta ahora. Aunque la participación de los

mastocitos en las reacciones alérgicas/inflamatorias mediadas por IgE ha sido estudiada exhaustivamente, el papel de los mastocitos en las enfermedades autoinmunes es más desconocido [164]. Sin embargo, cada vez se conoce mejor la importancia de la IgE en las enfermedades autoinmunes [165,166]. En estudios en ratones, se atribuye a los mastocitos un papel importante para suprimir la progresión de las lesiones cutáneas similares al LE cutáneo [167,168]. Varios estudios han demostrado una mayor frecuencia de mastocitos en el LE sistémico y cutáneo [169] y en la mucinosis cutánea en general [170]. En nuestro estudio, mediante inmunohistoquímica, no encontramos diferencias en la expresión de triptasa entre LEP y LTP, aunque llamaba la atención la morfología más redondeada de los mastocitos en los casos de LEP y más elongada en los casos de LTP.

5.2.3. SOBREEXPRESIÓN DE LOS GENES RELACIONADOS CON LAS CÉLULAS DENDRÍTICAS EN LEP

En nuestro estudio, los genes relacionados con las células dendríticas (CD), estaban significativamente sobreexpresados en LEP. En estudios anteriores de LE cutáneo crónico también se ha observado una regulación al alza de los genes relacionados con las células dendríticas [163]. En la piel, DC-SIGN (CD209) sólo se expresa en las células dendríticas dérmicas [171]. Sin embargo, los macrófagos CD163+ expresan conjuntamente CD209 en la piel normal [172] y en el LE crónico discoide [173]. Cabe señalar que las células CD123+ plasmacitoides, que son un sello distintivo del lupus eritematoso, presentan un patrón inmunohistoquímico diferente al de las CD209 en otras dermatitis de interfase [174].

5.2.4. SOBREEXPRESIÓN DE LOS GENES RELACIONADOS CON LA APOPTOSIS EN LEP

La alteración del aclaramiento de las células apoptóticas que conduce a la formación de autoanticuerpos es un factor fundamental en la patogenia del LE. Se ha descrito un subconjunto de genes diferencialmente expresados en el LECC

que se superpone con los genes diferencialmente expresados de LES, incluidos los vinculados a la apoptosis [146]. Un estudio previo, mediante inmunohistoquímica y la técnica de fragmentación de ADN TUNEL, demostró niveles más altos de marcadores de apoptosis en el LEC discoide y en la LEP en comparación con la piel normal, [175]. En nuestro estudio, *MIB1* y *EFHC1*, que son marcadores apoptóticos, se sobreexpresaron diferencialmente en los casos de LEP. Además, la vía p53, que se ha relacionado con las vías apoptóticas en el LE cutáneo [176], también fue más relevante en el LEP que en el LTP.

Además, en nuestros casos de LEP hemos observado sobreexpresión de vías de señalización que se han descrito en otras presentaciones clínicas de LE (NF- κ B, VEGF, PLC y CXCR4) [177–180].

5.3. GENES SOBREEXPRESADOS EN LOS CASOS ASOCIADOS CON SHF

Sólo tres casos presentaron SHF, dos de LTP (LTP5 y LTP6) y uno de LEP que además presentaba lupus eritematoso sistémico (LEP1).

Al comparar la expresión génica de los casos de LTP con y sin HPS, observamos sólo dos GED. El primero fue el *S100A12*, que codifica la calgranulina C, un miembro de la familia S100 expresado por neutrófilos y macrófagos. Se ha demostrado que esta proteína es un marcador sistémico de inflamación [181]. El segundo GED fue el *GYPC*, que codifica la glicoforina C, una proteína transmembrana de los glóbulos rojos.

Al enfrentar todos los casos con SHF incluyendo LTP y LEP, a los casos no asociados a SHF, además de *S100A12*, se encontraron otros 6 GED relacionados con adhesión celular y eosinófilos (*ADGRE1*), macrófagos (*FPR2*, *MME*), células dendríticas (*CD274*, *MME*), célula CD4⁺ naïve (*FPR1*), células CD8⁺ (*BATF3*) y neutrófilos (*MME*). En estudios previos, se ha sugerido que la patogenia del SHF secundario se ve influenciada no solo por una respuesta citotóxica alterada sino también a una capacidad de generar una respuesta inflamatoria más grave [182].

Se necesitan más estudios para determinar si nuestros hallazgos pueden ayudar a predecir el desarrollo del SHF en estos pacientes, ya que esto sería de gran utilidad de cara al pronóstico, como hemos comentado anteriormente.

5.4. CASOS DE SOLAPAMIENTO Y SITUACIÓN CON RESPECTO A LA PANICULITIS LÚPICA Y EL LINFOMA T PANICULÍTICO

El hecho de que el análisis no supervisado categorice el 80% de los casos de solapamiento en el grupo de LEP es muy interesante, y apoya la posibilidad de que la firma biológica de estos casos difíciles de categorizar está más próxima al LEP. Comparados con los casos de LEP, los casos de solapamiento mostraron 18 genes diferencialmente expresados y tenían una firma más débil de mastocitos, p53, neutrófilos, IGF1, G1, ciclo celular, macrófagos M2, proliferación, RACCYCD, NOTCH y vías RELA (Fig. 6). Sin embargo, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas que estuvieran relacionadas con las otras vías analizadas. Uno de los casos respondió mejor a los fármacos antipalúdicos de síntesis, que se utilizan frecuentemente para tratar la paniculitis lúpica, que a la prednisona (respuesta parcial) o al metotrexato (sin respuesta). Otros dos casos fueron tratados con éxito con antipalúdicos de síntesis.

5.5. AUTOINMUNIDAD Y LINFOMA

Como hemos comentado en la introducción, alrededor del 20% de los LTP se asocian con una enfermedad autoinmune, alcanzando el 40% en algunas series [5]. Además, se han descrito casos de solapamiento histopatológico como los casos presentados en este estudio. Hemos podido demostrar que a pesar de que el LTP y el LEP tienen firmas moleculares diferenciales, comparten la expresión de múltiples genes. Por tanto, existe un solapamiento no sólo clínico y patológico, sino también molecular.

La relación entre autoinmunidad y linfoma se ha investigado ampliamente. Se ha relacionado el LE con una mayor predisposición a enfermedades malignas.

En concreto, se ha observado una razón de incidencia estandarizada (RIE) de 3,02 (IC 95%:2,48-3,63) si nos referimos a enfermedades hematológicas, incluyendo linfomas, leucemia y mieloma múltiple. Con respecto al LNH, el riesgo aumenta a 4,39 (IC 95%: 3,46-5,49) [183]. Se ha propuesto que esta mayor predisposición puede deberse a factores no genéticos, como la estimulación antigénica crónica y la inflamación o el tratamiento inmunomodulador [184]. Es necesario realizar más estudios para investigar el posible papel de la estimulación crónica de antígenos en la patogénesis del LTP, como se ha demostrado en otros linfomas, y para comprender los mecanismos moleculares de su transformación neoplásica, si la hubiera.

5.6. MUTACIONES EN LTP

En el presente estudio describimos por primera vez mutaciones en los genes *EZH2* y *ARID1A* en LTP. Además, se han identificado nuevas variantes en genes previamente descritos en este linfoma. Teniendo en cuenta los estudios previos, la mayoría de los genes alterados incluyen genes relacionados con la epigenética (*TET2*, *DNMT3A*, *EZH2*, *ARID1A* y *NCOR1*), el gen supresor de tumores *TP53* y *PLCG1* [7,9,10].

5.6.1. MUTACIONES EN MODIFICADORES EPIGENÉTICOS EN LTP

Con la introducción de la NGS, uno de los resultados más sorprendentes de los esfuerzos de secuenciación de todo el sistema fue que la regeneración de la cromatina y los procesos centrados en la epigenética, que anteriormente sólo habían sido vagamente relacionados con la oncogénesis, estaban estrechamente relacionados con el desarrollo del cáncer [138]. Esta desregulación epigenética es una característica notable de múltiples neoplasias malignas tanto hematológicas como no hematológicas. En nuestra serie, el 66,7% de los LTP mostraron mutaciones en los genes que codifican modificadores epigenéticos, de manera

similar a la serie de casos de Li *et al.* (72%) [7]. Entre otros, este grupo de genes incluye *NCOR1*, *TET2* y *DNMT3A* que se han encontrado mutados previamente en LTP, lo que sugiere un papel patogénico relevante. Sin embargo, nuestros casos muestran diferentes variantes de estos genes.

ARID1A

ARID1A es un gen supresor de tumores que se inactiva por mutación en varios tipos de cáncer, incluidos los cánceres de endometrio, ovario y vejiga [185]. *ARID1A* participa en la alteración de la estructura de la cromatina para diversas funciones celulares, incluida la transcripción, la síntesis de ADN y la reparación del ADN [186]. *ARID1A* ayuda a reclutar a otros miembros del complejo SWI / SWF, como el complejo SMARCA. Conviene recordar que se han descrito previamente mutaciones en genes estrechamente relacionados con *ARID1A* en LTP, incluidos *SMARCA4* y *ARID1B* [7]. Los parálogos canónicos específicos de BAF (cBAF) *ARID1A* y *ARID1B* son sintéticamente letales en algunos contextos, pero las mutaciones simultáneas en ambos *ARID1* son frecuentes en el cáncer [187]. En nuestro estudio, detectamos dos variantes diferentes de significado desconocido con una frecuencia alélica (FA) de 43,6% y 34,4%, respectivamente.

EZH2

EZH2 actúa como un represor epigenético y se ha observado regulación al alza en pacientes con linfoma periférico de células T con una tasa de supervivencia más baja [188]. Además, se ha demostrado que *EZH2* promueve la proliferación de células T CD8 + [189]. Uno de nuestros casos mostró una mutación en el codón 5 que no había sido descrita previamente con una FA del 12,8% con significado incierto.

NCOR1

NCOR1 codifica una proteína implicada en la remodelación de la cromatina y la represión de la transcripción. Establece un puente entre las enzimas represivas modificadoras de la cromatina, como las histonas desacetilasas (HDAC), y se ha

demostrado que desempeña un papel en la supervivencia celular y la apoptosis [190]. Dos de nuestros casos mostraron la misma variante de *NCOR1* con una FA <1 y 24,8%, respectivamente. Dos casos anteriores de LTP mostraron otras variantes mutaciones en este gen [7]. Las mutaciones en otros modificadores de histonas como *CREBBP*, *KMT2D* y *DOT1L* también se han descrito previamente en LTP [7].

TET2

Se han observado mutaciones de *TET2* en otros linfomas [191], incluido el LTP [7,8,10]. La variante de *TET2* Cys1221Tyr (C1221Y), que presentaba uno de nuestros casos, se ha descrito previamente en leucemia mieloide aguda (LMA) [192,193], leucemia mielomonocítica crónica (LMMC) [194], síndrome mielodisplásico (SMD) con exceso de blastos [195] y carcinoma de células escamosas de esófago [196]; pero no en LTP. Nuestro caso mostraba una FA del 12% y su significado es desconocido.

DNMT3A

Se han descrito mutaciones en el dominio de ADN-metilasa *DNMT3A* Tyr735Cys (Y735C) en la LMA [197–199], el SMD [195], el cáncer de mama [200] y el linfoma esplénico de la zona marginal [201], como uno de nuestros casos de LTP. En el mismo paciente, detectamos dos mutaciones adicionales ubicadas en los codones 583 y 546 con una FA <1%. Se han descrito mutaciones somáticas que alteran el estado de metilación del ADN en otras neoplasias malignas de células T [202,203] y neoplasias malignas mieloides [204]. Con respecto al LTP, sólo hay un caso previamente descrito que mostraba otra variante en este gen [10].

5.6.2. MUTACIONES EN *TP53* EN LTP

Hemos detectado un polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) en *TP53*Pro72Arg (P72R) en el 50% de nuestros casos. Este cambio, que afecta al dominio rico en prolinas, se ha descrito previamente en otros linfomas pero no en LTP [71]. Estudios previos demuestran una apoptosis deficiente y un mayor

riesgo de desarrollo de cáncer relacionados con esta variante [205,206]. Sin embargo, un estudio sobre cáncer de ovario encontró que la mutación de P72R contribuye a la sobreexpresión de p53 en células tumorales sin deterioro de la apoptosis [207]. Se observó una mayor tasa de metástasis y una peor supervivencia global en el carcinoma de mama que alberga el polimorfismo del codón 72 [208]. Dos de nuestros pacientes estaban vivos en el momento de último seguimiento (LTP1, LTP4) y un paciente falleció por otra enfermedad antes de recibir tratamiento (LTP3). Curiosamente, un paciente tenía artritis reumatoide (LTP4) y otro, esclerosis múltiple (LTP3). Además, la variante A83V, que se ha descrito anteriormente en el cáncer de ovario, también se encontró en uno de nuestros casos [209]. Se ha detectado una variante diferente de mutación en este gen en casos de LTP [7].

5.6.3. MUTACIONES EN *PLCG1* EN LTP

Se detectó una mutación oncogénica de *PLCG1* (p.Ile813Thr) en un caso, sin embargo, la frecuencia alélica (FA) alta apunta a una posible mutación o polimorfismo germinal. La misma mutación del gen que codifica la fosfolipasa C $\gamma 1$, que juega un papel importante en la regulación de las cascadas de señalización intracelular, se ha descrito en el cáncer colorrectal avanzado con una FA 46% [210], y como una mutación activadora en la lipofuscinosis neuronal ceroida [211]. En casos aislados de ependimoma anaplásico y LMA también se ha mostrado esta variante con significado desconocido. Se han descrito diferentes variantes en un caso de LTP y otros linfomas de células T [9,212], incluida la MF [213].

5.6.4. MUTACIONES EN *HAVCR2* EN LTP

La mutación de la línea germinal de *HAVCR2*, el gen que codifica la proteína transmembrana TIM-3, se ha descrito previamente en un alto porcentaje de pacientes con LTP esporádico, que oscila entre el 25 y el 85% de los casos analizados [8,9,11]. Curiosamente, se han encontrado dos mutaciones

principales, muy relacionadas con el origen étnico de los pacientes: mientras que la variante Y82C está relacionada con la ascendencia asiática y polinesia; I97M se ha encontrado con mayor frecuencia en pacientes de origen norteafricano o caucásico. Curiosamente, la variante I97M es excepcional en población asiática [9], mientras que la variante Y82C solo se ha encontrado escasamente en la población no asiática y en la mayoría de los casos en heterocigosis [8,11]. Sólo hay un caso previamente descrito de la variante Y82C del gen *HAVCR2* en homocigosis en un paciente sudamericano [8].

En nuestro estudio, encontramos la mutación del gen *HAVCR2* con una frecuencia más baja que la descrita anteriormente (solo el 17% de los casos estudiados). Detectamos la variante Y82C en homocigosis. La paciente era una mujer española de 26 años sin antecedentes familiares previos de linfoma o enfermedad autoinmune. Se han descrito las variantes Y82C e I97M de *HAVCR2* con o sin asociación a síndrome hemofagocítico (SHF) [8,9,11]. Mientras que Gayden *et al.* observaron SHF en el 85% de los pacientes con mutaciones de TIM3 [8], Polprasert *et al.* lo encontraron solo en el 18% de los pacientes [9], y Sonigo *et al.* no encontraron asociación, aunque sí con SHF grave [11]. Curiosamente, mientras que la prevalencia esperada mundial de SHF es del 6-20% de los casos de LTP [1], se encontró SHF en el 85%, 30% y 18% de los casos incluidos en las series de casos estudiados, respectivamente. Las diferencias de origen étnico o de edad al inicio de la enfermedad (mediana de edad de 26 [8], 32 [9] y 42 años [11]) podrían estar implicadas en esas diferencias. Nuestra paciente presentó síntomas sistémicos y mutaciones adicionales (*ARID1A*, *EZH2*, *TP53* y *NCOR1*), pero no SHF. Sin embargo, en nuestra serie, ninguno de los pacientes en los que se realizó estudio mutacional padecía SHF.

5.6.5. DIANAS TERAPÉUTICAS

También confiere especial interés a nuestro estudio el hecho de que las mutaciones detectadas aquí podrían suponer dianas útiles para el tratamiento.

Existen varias estrategias dirigidas al oncogen p53 en cáncer. El polimorfismo en el codón 72 (Arg/Pro) de p53, el factor transcriptor codificado por *TP53*, afecta la sensibilidad celular a fármacos anticancerosos como la doxorrubicina mediante la inhibición de p73, una proteína relacionada con p53 [214,215]. Por tanto, esto podría explicar la resistencia del LTP a la quimioterapia convencional en la que se suelen utilizar regímenes con antraciclinas (CHOP; ciclofosfamida, doxorrubicina, vincristina y prednisona).

Los fármacos dirigidos a modificadores epigenéticos han mostrado resultados prometedores en otros linfomas que albergan mutaciones en estos genes. Tal es el caso de los fármacos demetilantes (por ejemplo, 5-AZA) ya de uso estandarizado para otras patologías que comparten algunas de estas alteraciones [216], o los inhibidores de la histona metiltransferasa para neoplasias con mutación *EZH2* [217]. De hecho, se han descrito algunos casos de LTP con buena respuesta a inhibidores de histona deacetilasa [124,218].

6. CONCLUSIONES

1. El linfoma T paniculítico muestra una firma molecular diferente de la paniculitis lúpica.
2. El 80% de los casos de solapamiento entre linfoma T paniculítico y paniculitis lúpica se parece más a la paniculitis lúpica, desde el punto de vista molecular.
3. El grupo de linfoma T paniculítico se caracteriza por la firma molecular de citotoxicidad y la de células T CD8⁺ exhaustas.
4. El grupo de paniculitis lúpica se caracteriza por la sobreexpresión de las vías de los mastocitos, las células B, PLC, NF-κB, VEGF, p53 y CXCR4, y la firma de las células dendríticas.
5. Los casos de linfoma T paniculítico con síndrome hemofagocítico muestran dos genes expresados diferencialmente: *S100A12* y *GYPE*, comparados con los casos sin síndrome hemofagocítico.
6. Hemos encontrado ocho nuevas variantes en cinco genes ya descritos en linfoma T paniculítico (*NCOR1*, *TET2*, *DNMT3A*, *TP53* y *PLCG1*) y hemos descrito dos nuevas variantes en genes que no se habían descrito previamente (*ARID1A* y *EZH2*). Las mutaciones en *TP53* podrían representar resistencia a quimioterapia (doxorrubicina) y las mutaciones en modificadores epigenéticos podrían representar potenciales terapias dirigidas.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] Jaffe ES, Gaulard P, Cerroni L. Subcutaneous panniculitis-like T-cell lymphoma. WHO Classification Tumours of Haematopoietic Lymphoid Tissues. Lyon: International Agency for Research on Cancer 2008; p. 383–385.
- [2] Pincus LB, LeBoit PE, McCalmont TH, et al. Subcutaneous panniculitis-like T-cell lymphoma with overlapping clinicopathologic features of lupus erythematosus: coexistence of 2 entities? *Am J Dermatopathol.* 2009;31:520–526.
- [3] Bosisio F, Boi S, Caputo V, et al. Lobular panniculitic infiltrates with overlapping histopathologic features of lupus panniculitis (lupus profundus) and subcutaneous T-cell lymphoma: a conceptual and practical dilemma. *Am J Surg Pathol.* 2015;39:206–211.
- [4] Magro CM, Crowson AN, Kovatich AJ, et al. Lupus profundus, indeterminate lymphocytic lobular panniculitis and subcutaneous T-cell lymphoma: a spectrum of subcuticular T-cell lymphoid dyscrasia. *J Cutan Pathol.* 2001;28:235–247.
- [5] Michonneau D, Petrella T, Ortonne N, et al. Subcutaneous panniculitis-like T-cell lymphoma: immunosuppressive drugs induce better response than polychemotherapy. *Acta Derm Venereol.* 2017;97:358–364.
- [6] Hahtola S, Burghart E, Jeskanen L, et al. Clinicopathological characterization and genomic aberrations in subcutaneous panniculitis-like T-cell lymphoma. *J Invest Dermatol.* 2008;128:2304–2309.
- [7] Li Z, Lu L, Zhou Z, et al. Recurrent mutations in epigenetic modifiers and the *PI3K/AKT/mTOR* pathway in subcutaneous panniculitis-like T-cell lymphoma. *Br J Haematol.* 2018;181:406–410.

-
- [8] Gayden T, Sepulveda FE, Khuong-Quang D-A, et al. Germline *HAVCR2* mutations altering TIM-3 characterize subcutaneous panniculitis-like T cell lymphomas with hemophagocytic lymphohistiocytic syndrome. *Nat Genet.* 2018;50:1650–1657.
- [9] Polprasert C, Takeuchi Y, Kakiuchi N, et al. Frequent germline mutations of *HAVCR2* in sporadic subcutaneous panniculitis-like T-cell lymphoma. *Blood Adv.* 2019;3:588–595.
- [10] Fernandez-Pol S, Costa HA, Steiner DF, et al. High-throughput sequencing of subcutaneous panniculitis-like T-cell lymphoma reveals candidate pathogenic mutations. *Appl Immunohistochem Mol Morphol AIMM.* 2019;27:740–748.
- [11] Sonigo G, Battistella M, Beylot-Barry M, et al. *HAVCR2* mutations are associated with severe hemophagocytic syndrome in subcutaneous panniculitis-like T-cell lymphoma. *Blood.* 2020;
- [12] Maliniemi P, Hahtola S, Ovaska K, et al. Molecular characterization of subcutaneous panniculitis-like T-cell lymphoma reveals upregulation of immunosuppression- and autoimmunity-associated genes. *Orphanet J Rare Dis* [Internet]. 2014 [cited 2019 Jul 22];9. Available from: <http://ojrd.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13023-014-0160-2>.
- [13] Gonzalez EG, Selvi E, Lorenzini S, et al. Subcutaneous panniculitis-like T-cell lymphoma misdiagnosed as lupus erythematosus panniculitis. *Clin Rheumatol.* 2007;26:244–246.
- [14] Willemze R, Kerl H, Sterry W, et al. EORTC classification for primary cutaneous lymphomas: a proposal from the Cutaneous Lymphoma Study Group of the European Organization for Research and Treatment of Cancer. *Blood.* 1997;90:354–371.
- [15] Jaffe ES, Harris NL, Stein H et al. World Health Organization

Classification of Tumours: Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. 2001, IARC Press. Lyon, France

[16] Salhany KE, Macon WR, Choi JK, et al. Subcutaneous panniculitis-like T-cell lymphoma: clinicopathologic, immunophenotypic, and genotypic analysis of alpha/beta and gamma/delta subtypes. *Am J Surg Pathol*. 1998;22:881–893.

[17] Toro JR, Liewehr DJ, Pabby N, et al. Gamma-delta T-cell phenotype is associated with significantly decreased survival in cutaneous T-cell lymphoma. *Blood*. 2003;101:3407–3412.

[18] Hoque SR, Child FJ, Whittaker SJ, et al. Subcutaneous panniculitis-like T-cell lymphoma: a clinicopathological, immunophenotypic and molecular analysis of six patients. *Br J Dermatol*. 2003;148:516–525.

[19] Willemze R, Jansen PM, Cerroni L, et al. Subcutaneous panniculitis-like T-cell lymphoma: definition, classification, and prognostic factors: an EORTC Cutaneous Lymphoma Group Study of 83 cases. *Blood*. 2008;111:838–845.

[20] Willemze R, Jaffe ES, Burg G, et al. WHO-EORTC classification for cutaneous lymphomas. *Blood*. 2005;105:3768–3785.

[21] Winkelmann RK, Bowie EJ. Hemorrhagic diathesis associated with benign histiocytic, cytophagic panniculitis and systemic histiocytosis. *Arch Intern Med*. 1980;140:1460–1463.

[22] Alegre VA, Winkelmann RK. Histiocytic cytophagic panniculitis. *J Am Acad Dermatol*. 1989;20:177–185.

[23] Aronson IK, West DP, Variakojis D, et al. Fatal panniculitis. *J Am Acad Dermatol*. 1985;12:535–551.

[24] White JW, Winkelmann RK. Weber-Christian panniculitis: a review of 30 cases with this diagnosis. *J Am Acad Dermatol*. 1998;39:56–62.

[25] Willemze R. Cutaneous lymphomas with a panniculitic presentation.

Semin Diagn Pathol. 2017;34:36–43.

[26] Cerroni, Lorenzo. Skin Lymphoma: The Illustrated Guide. 5th ed. Wiley; 2020.

[27] Swerdlow SH, Campo E, Harris NL et al. Introduction and overview of the classification of lymphoid neoplasms. In: Jaffe ES, Campo E, Harris NL et al. WHO Classification Tumours of Haematopoietic Lymphoid Tissues. Lyon: International Agency for Research on Cancer; 2017. p. 196.

[28] Kumar S, Krenacs L, Medeiros J, et al. Subcutaneous panniculitic T-cell lymphoma is a tumor of cytotoxic T lymphocytes. Hum Pathol. 1998;29:397–403.

[29] Huppmann AR, Xi L, Raffeld M, et al. Subcutaneous panniculitis-like T-cell lymphoma in the pediatric age group: a lymphoma of low malignant potential. Pediatr Blood Cancer. 2013;60:1165–1170.

[30] Michot C, Costes V, Gerard-Dran D, et al. Subcutaneous panniculitis-like T-cell lymphoma in a patient receiving etanercept for rheumatoid arthritis. Br J Dermatol. 2009;160:889–890.

[31] Yokota K, Akiyama Y, Adachi D, et al. Subcutaneous panniculitis-like T-cell lymphoma accompanied by Sjögren's syndrome. Scand J Rheumatol. 2009;38:494–495.

[32] Chiu H-Y, He G-Y, Chen J-S, et al. Subcutaneous panniculitis-like T-cell lymphoma presenting with clinicopathologic features of dermatomyositis. J Am Acad Dermatol. 2011;64:e121-123.

[33] Iqbal K, Bott J, Greenblatt D, et al. Subcutaneous panniculitis-like T-cell lymphoma in association with sarcoidosis. Clin Exp Dermatol. 2011;36:677–679.

[34] Nakamura H, Sugai T, Kato M, et al. Subcutaneous panniculitis-like T-cell lymphoma with haemophagocytic syndrome during tocilizumab therapy for juvenile idiopathic arthritis. Clin Exp Rheumatol. 2017;35:174.

-
- [35] Lee WJ, Lee SH, Moon IJ, et al. Relative frequency, clinical features, and survival outcomes of 395 patients with cutaneous lymphoma in Korea: a subgroup analysis per 10-year period. *Acta Derm Venereol*. 2016;96:888–893.
- [36] Massone C, Kodama K, Salmhofer W, et al. Lupus erythematosus panniculitis (lupus profundus): clinical, histopathological, and molecular analysis of nine cases. *J Cutan Pathol*. 2005;32:396–404.
- [37] Honda Y, Otsuka A, Nonomura Y, et al. CCR5 and CXCR3 expression in a case of subcutaneous panniculitis-like T-cell lymphoma. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2016;30:1413–1415.
- [38] Kitayama N, Otsuka A, Honda Y, et al. CCR4 and CCR5 expression in a case of subcutaneous panniculitis-like T-cell lymphoma. *Eur J Dermatol*. 2017;27:414–415.
- [39] Török L, Gurbity TP, Kirschner A, et al. Panniculitis-like T-cell lymphoma clinically manifested as alopecia. *Br J Dermatol*. 2002;147:785–788.
- [40] Weenig RH, Daniel Su WP. Subcutaneous panniculitis-like T-cell lymphoma presenting as venous stasis ulceration. *Int J Dermatol*. 2006;45:1083–1085.
- [41] Gonzalez CL, Medeiros LJ, Braziel RM, et al. T-cell lymphoma involving subcutaneous tissue. A clinicopathologic entity commonly associated with hemophagocytic syndrome. *Am J Surg Pathol*. 1991;15:17–27.
- [42] van der Weyden C, McCormack C, Lade S, et al. Rare T-Cell Subtypes. *Cancer Treat Res*. 2019;176:195–224.
- [43] Abe Y, Narita K, Kobayashi H, et al. 18F-FDG PET/CT-guided diagnosis and evaluation of treatment response to cyclosporine a in maldistributed subcutaneous panniculitis-like T-cell lymphoma without typical skin rash. *Clin Nucl Med*. 2019;

-
- [44] Scott RB, Robb-Smith AHT. Histiocytic medullary reticulosis. *Lancet*. 1939;2:194–198.
- [45] Janka GE. Hemophagocytic syndromes. *Blood Rev*. 2007;21:245–253.
- [46] Pachlopnik Schmid J, Schmid JP, Côte M, et al. Inherited defects in lymphocyte cytotoxic activity. *Immunol Rev*. 2010;235:10–23.
- [47] Janka GE, Lehmborg K. Hemophagocytic syndromes--an update. *Blood Rev*. 2014;28:135–142.
- [48] Takahashi N, Chubachi A, Kume M, et al. A clinical analysis of 52 adult patients with hemophagocytic syndrome: the prognostic significance of the underlying diseases. *Int J Hematol*. 2001;74:209–213.
- [49] Notaro E, Shustov A, Chen X, et al. Kikuchi-Fujimoto disease associated with subcutaneous panniculitis-like T-cell lymphoma. *Am J Dermatopathol*. 2016;38:e77-80.
- [50] Ma S, Zhao Y, Leudke C, et al. Subcutaneous panniculitis-like T-cell lymphoma in a 25-year-old male patient with sickle cell disease. *Pathol Res Pract*. 2019;215:152400.
- [51] Barreau M, Pontoizeau J, Courtheoux F, et al. [Cutaneous lesions in a woman treated with adalimumab]. *Rev Med Interne*. 2015;36:862–864.
- [52] Rudolph N, Klemke C-D, Ziemer M, et al. Hemophagocytic lymphohistiocytosis associated with subcutaneous panniculitis-like T-cell lymphoma. *J Dtsch Dermatol Ges J Ger Soc Dermatol*. 2016;14:1140–1142.
- [53] Ma L, Bandarchi B, Glusac EJ. Fatal subcutaneous panniculitis-like T-cell lymphoma with interface change and dermal mucin, a dead ringer for lupus erythematosus. *J Cutan Pathol*. 2005;32:360–365.
- [54] LeBlanc RE, Tavallaee M, Kim YH, et al. Useful parameters for distinguishing subcutaneous panniculitis-like T-cell lymphoma from lupus

- erythematosus panniculitis. *Am J Surg Pathol*. 2016;40:745–754.
- [55] Sitthinamsuwan P, Pattanaprichakul P, Treetipsatit J, et al. Subcutaneous panniculitis-like T-cell lymphoma versus lupus erythematosus panniculitis: distinction by means of the periadipocytic cell proliferation index. *Am J Dermatopathol*. 2018;40:567–574.
- [56] Lozzi GP, Massone C, Citarella L, et al. Rimming of adipocytes by neoplastic lymphocytes: a histopathologic feature not restricted to subcutaneous T-cell lymphoma. *Am J Dermatopathol*. 2006;28:9–12.
- [57] Laggis C, Miles R, Stephens DM, et al. Cutaneous mantle cell lymphoma histomorphologically mimicking subcutaneous panniculitis-like T-cell lymphoma: case report. *J Cutan Pathol*. 2019;46:538–541.
- [58] Santonja C, Gonzalo I, Feito M, et al. Lipoatrophic panniculitis of the ankles in childhood: differential diagnosis with subcutaneous panniculitis-like T-cell lymphoma. *Am J Dermatopathol*. 2012;34:295–300.
- [59] Lee C, Hsi A, Lazova R. Subcutaneous panniculitis-like T-cell lymphoma with granulomas as the predominant feature. *Am J Dermatopathol*. 2019;41:667–670.
- [60] Liao J-Y, Chuang S-S, Chu C-Y, et al. The presence of clusters of plasmacytoid dendritic cells is a helpful feature for differentiating lupus panniculitis from subcutaneous panniculitis-like T-cell lymphoma. *Histopathology*. 2013;62:1057–1066.
- [61] Weenig RH, Ng CS, Perniciaro C. Subcutaneous panniculitis-like T-cell lymphoma: an elusive case presenting as lipomembranous panniculitis and a review of 72 cases in the literature. *Am J Dermatopathol*. 2001;23:206–215.
- [62] Massone C, Lozzi GP, Egberts F, et al. The protean spectrum of non-Hodgkin lymphomas with prominent involvement of subcutaneous fat. *J Cutan Pathol*. 2006;33:418–425.

- [63] Pulitzer M, Geller S, Kumar E, et al. T-cell receptor- δ expression and $\gamma\delta$ + T-cell infiltrates in primary cutaneous $\gamma\delta$ T-cell lymphoma and other cutaneous T-cell lymphoproliferative disorders. *Histopathology*. 2018;73:653–662.
- [64] Chen SJT, Tse JY, Harms PW, et al. Utility of CD123 immunohistochemistry in differentiating lupus erythematosus from cutaneous T cell lymphoma. *Histopathology*. 2019;74:908–916.
- [65] Kong Y, Dai B, Kong J, et al. Subcutaneous panniculitis-like T-cell lymphoma: a clinicopathologic, immunophenotypic, and molecular study of 22 Asian cases according to WHO-EORTC classification. *Am J Surg Pathol*. 2008;32:1495–1502.
- [66] He A, Kwatra SG, Kazi N, et al. Atypical lymphocytic lobular panniculitis: an overlap condition with features of subcutaneous panniculitis-like T-cell lymphoma and lupus profundus. *BMJ Case Rep*. 2016;2016.
- [67] Cassis TB, Fearneyhough PK, Callen JP. Subcutaneous panniculitis-like T-cell lymphoma with vacuolar interface dermatitis resembling lupus erythematosus panniculitis. *J Am Acad Dermatol*. 2004;50:465–469.
- [68] Wu X, Subtil A, Craiglow B, et al. The coexistence of lupus erythematosus panniculitis and subcutaneous panniculitis-like T-cell lymphoma in the same patient. *JAAD Case Rep*. 2018;4:179–184.
- [69] Phatak S, Gupta L, Aggarwal A. A Young woman with panniculitis and cytopenia who later developed coagulopathy. *J Assoc Physicians India*. 2016;64:65–67.
- [70] Karenko L, Hahtola S, Päivinen S, et al. Primary cutaneous T-cell lymphomas show a deletion or translocation affecting NAV3, the human UNC-53 homologue. *Cancer Res*. 2005;65:8101–8110.
- [71] Forbes SA, Beare D, Gunasekaran P, et al. COSMIC: exploring the world's knowledge of somatic mutations in human cancer. *Nucleic Acids Res*.

2015;43:D805-811.

[72] Monney L, Sabatos CA, Gaglia JL, et al. Th1-specific cell surface protein Tim-3 regulates macrophage activation and severity of an autoimmune disease. *Nature*. 2002;415:536–541.

[73] Sabatos CA, Chakravarti S, Cha E, et al. Interaction of Tim-3 and Tim-3 ligand regulates T helper type 1 responses and induction of peripheral tolerance. *Nat Immunol*. 2003;4:1102–1110.

[74] Sánchez-Fueyo A, Tian J, Picarella D, et al. Tim-3 inhibits T helper type 1-mediated auto- and alloimmune responses and promotes immunological tolerance. *Nat Immunol*. 2003;4:1093–1101.

[75] Wang X, Magro CM. Human myxovirus resistance protein 1 (MxA) as a useful marker in the differential diagnosis of subcutaneous lymphoma vs. lupus erythematosus profundus. *Eur J Dermatol*. 2012;22:629–633.

[76] Arps DP, Patel RM. Lupus profundus (panniculitis): a potential mimic of subcutaneous panniculitis-like T-cell lymphoma. *Arch Pathol Lab Med*. 2013;137:1211–1215.

[77] Yi L, Qun S, Wenjie Z, et al. The presenting manifestations of subcutaneous panniculitis-like T-cell lymphoma and T-cell lymphoma and cutaneous $\gamma\delta$ T-cell lymphoma may mimic those of rheumatic diseases: a report of 11 cases. *Clin Rheumatol*. 2013;32:1169–1175.

[78] Heymann WR. The challenge of identifying identical twins: advances in differentiating lupus erythematosus panniculitis from subcutaneous panniculitis-like T-cell lymphoma. *Skinmed*. 2019;17:115–116.

[79] Kaposi M. *Pathologie und Therapie der Hautkrankheiten in Vorlesung für praktische Aerzte und Studierende*. Wien: Urban & Schwarzenberg; 1883.

[80] Arnold HL. Lupus erythematosus profundus; commentary and report of

four more cases. *Arch Dermatol*. 1956;73:15–33.

[81] Piccoli GB, Attini R, Vigotti FN, et al. NEMO syndrome (incontinentia pigmenti) and systemic lupus erythematosus: a new disease association. *Lupus*. 2012;21:675–681.

[82] Torrelo A, Noguera-Morel L, Hernández-Martín A, et al. Recurrent lipoatrophic panniculitis of children. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2017;31:536–543.

[83] Colmenero I, Molho-Pessach V, Torrelo A, et al. Emperipolesis: an additional common histopathologic finding in H syndrome and Rosai-Dorfman disease. *Am J Dermatopathol*. 2012;34:315–320.

[84] Merrill ED, Agbay R, Miranda RN, et al. Primary cutaneous T-cell lymphomas showing gamma-delta ($\gamma\delta$) Phenotype and predominantly epidermotropic pattern are clinicopathologically distinct from classic primary cutaneous $\gamma\delta$ T-cell lymphomas. *Am J Surg Pathol*. 2017;41:204–215.

[85] Daniels J, Doukas PG, Escala MEM, et al. Cellular origins and genetic landscape of cutaneous gamma delta T cell lymphomas. *Nat Commun*. 2020;11:1806.

[86] Hosler GA, Liégeois N, Anhalt GJ, et al. Transformation of cutaneous gamma/delta T-cell lymphoma following 15 years of indolent behavior. *J Cutan Pathol*. 2008;35:1063–1067.

[87] Koens L, Senff NJ, Vermeer MH, et al. Cutaneous gamma/delta T-cell lymphoma during treatment with etanercept for rheumatoid arthritis. *Acta Derm Venereol*. 2009;89:653–654.

[88] Caudron A, Bouaziz JD, Battistella M, et al. Two atypical cases of cutaneous gamma/delta T-cell lymphomas. *Dermatol Basel Switz*. 2011;222:297–303.

- [89] Magro CM, Wang X. Indolent primary cutaneous γ/δ T-cell lymphoma localized to the subcutaneous panniculus and its association with atypical lymphocytic lobular panniculitis. *Am J Clin Pathol*. 2012;138:50–56.
- [90] Vin H, Talpur R, Tetzlaff MT, et al. T-cell receptor- γ in gamma-delta phenotype cutaneous T-cell lymphoma can be accompanied by atypical expression of CD30, CD4, or TCR β F1 and an indolent clinical course. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*. 2014;14:e195-200.
- [91] Alexander RE, Webb AR, Abuel-Haija M, et al. Rapid progression of primary cutaneous gamma-delta T-cell lymphoma with an initial indolent clinical presentation. *Am J Dermatopathol*. 2014;36:839–842.
- [92] Takahashi Y, Takata K, Kato S, et al. Clinicopathological analysis of 17 primary cutaneous T-cell lymphoma of the $\gamma\delta$ phenotype from Japan. *Cancer Sci*. 2014;105:912–923.
- [93] Ali L, Young MR, Bayerl MG, et al. Gamma-delta T-cell lymphoma arising in a long-standing cutaneous plaque. *J Cutan Pathol*. 2015;42:987–991.
- [94] Soon CWM, Link M, Kim YH, et al. Primary cutaneous gamma-delta t-cell lymphoproliferative disorder in a 3-year-old boy. *Am J Dermatopathol*. 2015;37:567–569.
- [95] Benecke J, Géraud C, Nicolay JP. Cutaneous gamma-delta T-cell lymphoma with an initially indolent course mimicking lupus panniculitis. *Acta Derm Venereol*. 2017;97:665–666.
- [96] Khallaayoune M, Grange F, Condamina M, et al. Primary cutaneous gamma-delta T-cell lymphoma: not an aggressive disease in all cases. *Acta Derm Venereol*. 2020;100:adv00035.
- [97] von Dücker L, Fleischer M, Stutz N, et al. Primary cutaneous gamma-delta T-cell lymphoma with long-term indolent clinical course initially mimicking lupus erythematosus profundus. *Front Oncol*. 2020;10:133.

- [98] Arnulf B, Copie-Bergman C, Delfau-Larue MH, et al. Non hepatosplenic gamma delta T-cell lymphoma: a subset of cytotoxic lymphomas with mucosal or skin localization. *Blood*. 1998;91:1723–1731.
- [99] Aguilera P, Mascaró JM, Martínez A, et al. Cutaneous gamma/delta T-cell lymphoma: a histopathologic mimicker of lupus erythematosus profundus (lupus panniculitis). *J Am Acad Dermatol*. 2007;56:643–647.
- [100] Koizumi K, Sawada K, Nishio M, et al. Effective high-dose chemotherapy followed by autologous peripheral blood stem cell transplantation in a patient with the aggressive form of cytophagic histiocytic panniculitis. *Bone Marrow Transplant*. 1997;20:171–173.
- [101] Oshlies I, Simonitsch-Klupp I, Maldyk J, et al. Subcutaneous panniculitis-like T-cell lymphoma in children: a detailed clinicopathological description of 11 multifocal cases with a high frequency of haemophagocytic syndrome. *Br J Dermatol*. 2015;172:793–797.
- [102] Go RS, Wester SM. Immunophenotypic and molecular features, clinical outcomes, treatments, and prognostic factors associated with subcutaneous panniculitis-like T-cell lymphoma. *Cancer*. 2004;101:1404–1413.
- [103] Guenova E, Schanz S, Hoetzenecker W, et al. Systemic corticosteroids for subcutaneous panniculitis-like T-cell lymphoma. *Br J Dermatol*. 2014;171:891–894.
- [104] Johnston EE, LeBlanc RE, Kim J, et al. Subcutaneous panniculitis-like T-cell lymphoma: Pediatric case series demonstrating heterogeneous presentation and option for watchful waiting. *Pediatr Blood Cancer*. 2015;62:2025–2028.
- [105] Nagai K, Nakano N, Iwai T, et al. Pediatric subcutaneous panniculitis-like T-cell lymphoma with favorable result by immunosuppressive therapy: a report of two cases. *Pediatr Hematol Oncol*. 2014;31:528–533.
- [106] Tsukamoto Y, Katsunobu Y, Omura Y, et al. Subcutaneous panniculitis-

- like T-cell lymphoma: successful initial treatment with prednisolone and cyclosporin A. *Intern Med Tokyo Jpn.* 2006;45:21–24.
- [107] López-Lerma I, Peñate Y, Gallardo F, et al. Subcutaneous panniculitis-like T-cell lymphoma: Clinical features, therapeutic approach, and outcome in a case series of 16 patients. *J Am Acad Dermatol.* 2018;79:892–898.
- [108] Jang M-S, Baek J-W, Kang D-Y, et al. Subcutaneous panniculitis-like T-cell lymphoma: successful treatment with systemic steroid alone. *J Dermatol.* 2012;39:96–99.
- [109] Aragón-Miguel R, Calleja-Algarra A, Velasco-Tamariz V, et al. Is cyclosporine a good option for the treatment of subcutaneous panniculitis-like T-cell lymphoma associated with hemophagocytic syndrome? *Indian J Dermatol Venereol Leprol.* 2019;85:656–659.
- [110] Grinich E, Koon SM, Cascio MJ, et al. Subcutaneous panniculitis-like T-cell lymphoma responsive to combination therapy with methotrexate and corticosteroids. *Dermatol Online J.* 2018;24.
- [111] Asati DP, Ingle V, Joshi D, et al. Subcutaneous panniculitis-like T-cell lymphoma with macrophage activation syndrome treated by cyclosporine and prednisolone. *Indian Dermatol Online J.* 2016;7:529–532.
- [112] Lee WS, Hwang J-H, Kim MJ, et al. Cyclosporine A as a primary treatment for panniculitis-like t cell lymphoma: a case with a long-term remission. *Cancer Res Treat Of J Korean Cancer Assoc.* 2014;46:312–316.
- [113] Iqbal N, Raina V. Successful treatment of disseminated subcutaneous panniculitis-like T-cell lymphoma with single agent oral cyclosporine as a first line therapy. *Case Rep Dermatol Med.* 2014;2014:201836.
- [114] Chen R, Liu L, Liang YM. Treatment relapsed subcutaneous panniculitis-like T-cell lymphoma together HPS by Cyclosporin A. *Hematol Rep.* 2010;2:e9.

-
- [115] Mizutani S, Kuroda J, Shimura Y, et al. Cyclosporine A for chemotherapy-resistant subcutaneous panniculitis-like T cell lymphoma with hemophagocytic syndrome. *Acta Haematol.* 2011;126:8–12.
- [116] Rojnuckarin P, Nakorn TN, Assanasen T, et al. Cyclosporin in subcutaneous panniculitis-like T-cell lymphoma. *Leuk Lymphoma.* 2007;48:560–563.
- [117] Jung HR, Yun SY, Choi JH, et al. Cyclosporine in relapsed subcutaneous panniculitis-like t-cell lymphoma after autologous hematopoietic stem cell transplantation. *Cancer Res Treat Off J Korean Cancer Assoc.* 2011;43:255–259.
- [118] Heyman B, Beaven A. Mycophenolate mofetil for the treatment of subcutaneous panniculitis-like T-cell lymphoma: case report and review of the literature. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk.* 2018;18:e437–e440.
- [119] Mehta N, Wayne AS, Kim YH, et al. Bexarotene is active against subcutaneous panniculitis-like T-cell lymphoma in adult and pediatric populations. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk.* 2012;12:20–25.
- [120] Ohtsuka M, Miura T, Yamamoto T. Clinical characteristics, differential diagnosis, and treatment outcome of subcutaneous panniculitis-like T-cell lymphoma: a literature review of published Japanese cases. *Eur J Dermatol.* 2017;27:34–41.
- [121] Shikama N. Local radiation for cutaneous T-cell lymphoma other than mycosis fungoides and Sézary syndrome. *Chin Clin Oncol.* 2019;8:8.
- [122] Ichii M, Hatanaka K, Imakita M, et al. Successful treatment of refractory subcutaneous panniculitis-like T-cell lymphoma with allogeneic peripheral blood stem cell transplantation from HLA-mismatched sibling donor. *Leuk Lymphoma.* 2006;47:2250–2252.
- [123] Yuan L, Sun L, Bo J, et al. Durable remission in a patient with refractory subcutaneous panniculitis-like T-cell lymphoma relapse after allogeneic

hematopoietic stem cell transplantation through withdrawal of cyclosporine.

Ann Transplant. 2011;16:135–138.

[124] Gibson JF, Alpdogan O, Subtil A, et al. Hematopoietic stem cell transplantation for primary cutaneous $\gamma\delta$ T-cell lymphoma and refractory subcutaneous panniculitis-like T-cell lymphoma. J Am Acad Dermatol. 2015;72:1010-1015.e5.

[125] Lin T-A, Yang C-F, Liu Y-C, et al. Hematopoietic stem cell transplantation for subcutaneous panniculitis-like T-cell lymphoma: single center experience in an Asian population. Int J Hematol. 2019;109:187–196.

[126] Mukai HY, Okoshi Y, Shimizu S, et al. Successful treatment of a patient with subcutaneous panniculitis-like T-cell lymphoma with high-dose chemotherapy and total body irradiation. Eur J Haematol. 2003;70:413–416.

[127] Reimer P, Rüdiger T, Müller J, et al. Subcutaneous panniculitis-like T-cell lymphoma during pregnancy with successful autologous stem cell transplantation. Ann Hematol. 2003;82:305–309.

[128] Nakahashi H, Tsukamoto N, Yamane A, et al. Autologous peripheral blood stem cell transplantation to treat CHOP-refractory aggressive subcutaneous panniculitis-like T cell lymphoma. Acta Haematol. 2009;121:239–242.

[129] Sakurai E, Satoh T, Akiko Y-A, et al. Subcutaneous panniculitis-like T-cell lymphoma (SPTCL) with hemophagocytosis (HPS): successful treatment using high-dose chemotherapy (BFM-NHL & ALL-90) and autologous peripheral blood stem cell transplantation. J Clin Exp Hematop JCEH. 2013;53:135–140.

[130] Bashey S, Krathen M, Abdulla F, et al. Romidepsin is effective in subcutaneous panniculitis-like T-cell lymphoma. J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol. 2012;30:e221-225.

-
- [131] Jothishankar B, Espinosa ML, Zain J, et al. Complete response to romidepsin as monotherapy in treatment-resistant subcutaneous panniculitis-like T-cell lymphoma. *JAAD Case Rep.* 2020;6:1245–1247.
- [132] Hathaway T, Subtil A, Kuo P, et al. Efficacy of denileukin diftitox in subcutaneous panniculitis-like T-cell lymphoma. *Clin Lymphoma Myeloma.* 2007;7:541–545.
- [133] Lévy R, Fusaro M, Guerin F, et al. Efficacy of ruxolitinib in subcutaneous panniculitis-like T-cell lymphoma and hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Blood Adv.* 2020;4:1383–1387.
- [134] Ware O, Tarabadkar ES, Shustov A, et al. Pralatrexate for refractory or recurrent subcutaneous panniculitis-like T-cell lymphoma with hemophagocytic syndrome. *J Am Acad Dermatol.* 2020;82:489–491.
- [135] Ong SY, Phipps C, Kaur H, et al. Pralatrexate induces long-term remission in relapsed subcutaneous panniculitis-like T-cell lymphoma. *Ann Acad Med Singapore.* 2019;48:298–300.
- [136] Brown NA, Ross CW, Gudjonsson JE, et al. Subcutaneous panniculitis-like T-cell lymphoma with bone marrow involvement. *Am J Clin Pathol.* 2015;143:265–273.
- [137] Geller S, Hollmann TJ, Horwitz SM, et al. CCR4 expression in CD8+ cutaneous T-cell lymphomas and lymphoproliferative disorders and its implications for diagnosis and treatment. *Histopathology.* 2020;76:222–232.
- [138] Kadoch C, Crabtree GR. Mammalian SWI/SNF chromatin remodeling complexes and cancer: Mechanistic insights gained from human genomics. *Sci Adv.* 2015;1:e1500447.
- [139] Peñate Y, Servitje O, Machan S, et al. The first year of the AEVD Primary Cutaneous Lymphoma Registry. *Actas Dermosifiliogr.* 2018;109:610–616.

-
- [140] Tsang H-F, Xue VW, Koh S-P, et al. NanoString, a novel digital color-coded barcode technology: current and future applications in molecular diagnostics. *Expert Rev Mol Diagn.* 2017;17:95–103.
- [141] Subramanian A, Tamayo P, Mootha VK, et al. Gene set enrichment analysis: A knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc Natl Acad Sci.* 2005;102:15545–15550.
- [142] van Dongen JJM, Langerak AW, Brüggemann M, et al. Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936. *Leukemia.* 2003;17:2257–2317.
- [143] Groenen PJTA, Langerak AW, van Dongen JJM, et al. Pitfalls in TCR gene clonality testing: teaching cases. *J Hematop.* 2008;1:97–109.
- [144] Benjamin D, Sato T, Cibulskis K, et al. Calling somatic SNVs and indels with Mutect2. *bioRxiv.* 2019;861054.
- [145] Wenzel J, Proelss J, Wiechert A, et al. CXCR3-mediated recruitment of cytotoxic lymphocytes in lupus erythematosus profundus. *J Am Acad Dermatol.* 2007;56:648–650.
- [146] Dey-Rao R, Sinha AA. Genome-wide transcriptional profiling of chronic cutaneous lupus erythematosus (CCLE) peripheral blood identifies systemic alterations relevant to the skin manifestation. *Genomics.* 2015;105:90–100.
- [147] Fogagnolo L, Soares TCB, Senna CG, et al. Cytotoxic granules in distinct subsets of cutaneous lupus erythematosus. *Clin Exp Dermatol.* 2014;39:835–839.
- [148] Tsuzaka K, Nozaki K, Kumazawa C, et al. DNA microarray gene expression profile of T cells with the splice variants of TCRzeta mRNA observed in systemic lupus erythematosus. *J Immunol Baltim Md 1950.* 2006;176:949–956.

-
- [149] Wang L, Wu L-F, Lu X, et al. Integrated analyses of gene expression profiles digs out common markers for rheumatic diseases. *PloS One*. 2015;10:e0137522.
- [150] Fixemer J, Hummel JF, Arnold F, et al. Eomes cannot replace its paralog T-bet during expansion and differentiation of CD8 effector T cells. Oxenius A, editor. *PLOS Pathog*. 2020;16:e1008870.
- [151] Pearce EL, Mullen AC, Martins GA, et al. Control of effector CD8⁺ T cell function by the transcription factor Eomesodermin. *Science*. 2003;302:1041–1043.
- [152] Atreya I, Schimanski CC, Becker C, et al. The T-box transcription factor eomesodermin controls CD8 T cell activity and lymph node metastasis in human colorectal cancer. *Gut*. 2007;56:1572–1578.
- [153] Li Z, Wang H, Dong R, et al. Single-cell RNA-seq reveals characteristics of malignant cells and immune microenvironment in subcutaneous panniculitis-like T-cell lymphoma. *Front Oncol*. 2021;11:611580.
- [154] Lauffer F, Jargosch M, Krause L, et al. Type I immune response induces keratinocyte necroptosis and is associated with interface dermatitis. *J Invest Dermatol*. 2018;138:1785–1794.
- [155] Szabo SJ, Kim ST, Costa GL, et al. A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. *Cell*. 2000;100:655–669.
- [156] Hsi AC, Lee SJ, Rosman IS, et al. Expression of helper T cell master regulators in inflammatory dermatoses and primary cutaneous T-cell lymphomas: diagnostic implications. *J Am Acad Dermatol*. 2015;72:159–167.
- [157] Amador C, Greiner TC, Heavican TB, et al. Reproducing the molecular subclassification of peripheral T-cell lymphoma-NOS by immunohistochemistry. *Blood*. 2019;134:2159–2170.

- [158] Iqbal J, Wright G, Wang C, et al. Gene expression signatures delineate biological and prognostic subgroups in peripheral T-cell lymphoma. *Blood*. 2014;123:2915–2923.
- [159] Carney EF. T-cell exhaustion limits immune reactivity and is associated with good prognosis in autoimmune disease. *Nat Rev Nephrol*. 2015;11:503–503.
- [160] Querfeld C, Leung S, Myskowski PL, et al. Primary T cells from cutaneous T-cell lymphoma skin explants display an exhausted immune checkpoint profile. *Cancer Immunol Res*. 2018;6:900–909.
- [161] Fife BT, Pauken KE. The role of the PD-1 pathway in autoimmunity and peripheral tolerance. *Ann N Y Acad Sci*. 2011;1217:45–59.
- [162] Bosisio FM, Cerroni L. Expression of T-follicular helper markers in sequential biopsies of progressive mycosis fungoides and other primary cutaneous T-cell lymphomas. *Am J Dermatopathol*. 2015;37:115–121.
- [163] Sinha AA, Dey-Rao R. Genomic investigation of lupus in the skin. *J Invest Dermatol Symp Proc*. 2017;18:S75–S80.
- [164] Bulfone-Paus S, Bahri R. Mast cells as regulators of T cell responses. *Front Immunol*. 2015;6:394.
- [165] Maurer M, Altrichter S, Schmetzer O, et al. Immunoglobulin E-mediated autoimmunity. *Front Immunol*. 2018;9:689.
- [166] Sanjuan MA, Sagar D, Kolbeck R. Role of IgE in autoimmunity. *J Allergy Clin Immunol*. 2016;137:1651–1661.
- [167] Furukawa F, Yoshimasu T, Yamamoto Y, et al. Mast cells and histamine metabolism in skin lesions from MRL/MP-lpr/lpr mice. *Autoimmun Rev*. 2009;8:495–499.
- [168] Inaba Y, Kanazawa N, Yoshimasu T, et al. Severer lupus erythematosus-

like skin lesions in MRL/lpr mice with homozygous Kitwsh/wsh mutation. *Mod Rheumatol*. 2018;28:319–326.

[169] Kaczmarczyk-Seku a K, Dyduch G, Kostański M, et al. Mast cells in systemic and cutaneous lupus erythematosus. *Pol J Pathol Off J Pol Soc Pathol*. 2015;66:397–402.

[170] Martins C, Nascimento AP, Monte-Alto-Costa A, et al. Quantification of mast cells and blood vessels in the skin of patients with cutaneous mucinosis. *Am J Dermatopathol*. 2010;32:453–458.

[171] Zhou T, Chen Y, Hao L, et al. DC-SIGN and immunoregulation. *Cell Mol Immunol*. 2006;3:279–283.

[172] Ochoa MT, Loncaric A, Krutzik SR, et al. “dermal dendritic cells” comprise two distinct populations: CD1+ dendritic cells and CD209+ macrophages. *J Invest Dermatol*. 2008;128:2225–2231.

[173] Chong BF, Tseng L-C, Hosler GA, et al. A subset of CD163+ macrophages displays mixed polarizations in discoid lupus skin. *Arthritis Res Ther*. 2015;17:324.

[174] Harries M, Hardman J, Chaudhry I, et al. Profiling the human hair follicle immune system in lichen planopilaris and frontal fibrosing alopecia: can macrophage polarization differentiate these two conditions microscopically? *Br J Dermatol*. 2020;183:537–547.

[175] Sáenz-Corral CI, Vega-Memije ME, Martínez-Luna E, et al. Apoptosis in chronic cutaneous lupus erythematosus, discoid lupus, and lupus profundus. *Int J Clin Exp Pathol*. 2015;8:7260–7265.

[176] Zamolo G, Coklo M, Santini Dusevic D, et al. Expression of p53 and apoptosis in discoid lupus erythematosus. *Croat Med J*. 2005;46:678–684.

[177] Aterido A, Julià A, Carreira P, et al. Genome-wide pathway analysis

identifies VEGF pathway association with oral ulceration in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res Ther*. 2017;19:138.

[178] Poissonnier A, Guégan J-P, Nguyen HT, et al. Disrupting the CD95-PLC γ 1 interaction prevents Th17-driven inflammation. *Nat Chem Biol*. 2018;14:1079–1089.

[179] Wenzel J. Cutaneous lupus erythematosus: new insights into pathogenesis and therapeutic strategies. *Nat Rev Rheumatol*. 2019;15:519–532.

[180] Zhao W-L, Liu Y-Y, Zhang Q-L, et al. PRDM1 is involved in chemoresistance of T-cell lymphoma and down-regulated by the proteasome inhibitor. *Blood*. 2008;111:3867–3871.

[181] Meijer B, Gearry RB, Day AS. The Role of S100A12 as a Systemic Marker of Inflammation. *Int J Inflamm*. 2012;2012:1–6.

[182] Carvelli J, Piperoglou C, Farnarier C, et al. Functional and genetic testing in adults with HLH reveals an inflammatory profile rather than a cytotoxicity defect. *Blood*. 2020;136:542–552.

[183] Choi MY, Flood K, Bernatsky S, et al. A review on SLE and malignancy. *Best Pract Res Clin Rheumatol*. 2017;31:373–396.

[184] Din L, Sheikh M, Kosaraju N, et al. Genetic overlap between autoimmune diseases and non-Hodgkin lymphoma subtypes. *Genet Epidemiol*. 2019;43:844–863.

[185] Chakravarty D, Gao J, Phillips SM, et al. OncoKB: A precision Oncology Knowledge Base. *JCO Precis Oncol*. 2017;2017.

[186] Wu JN, Roberts CWM. ARID1A mutations in cancer: another epigenetic tumor suppressor? *Cancer Discov*. 2013;3:35–43.

[187] Wang Z, Chen K, Jia Y, et al. Dual ARID1A/ARID1B loss leads to rapid carcinogenesis and disruptive redistribution of BAF complexes. *Nat Cancer*.

2020;1:909–922.

- [188] Zhang H, Lv H, Jia X, et al. Clinical significance of enhancer of zeste homolog 2 and histone deacetylases 1 and 2 expression in peripheral T-cell lymphoma. *Oncol Lett*. 2019;18:1415–1423.
- [189] Chen G, Subedi K, Chakraborty S, et al. *EZH2* regulates activation-induced CD8⁺ T cell cycle progression via repressing *CDKN2A* and *CDKN1C* expression. *Front Immunol* . 2018;26;9:549.
- [190] Müller L, Hainberger D, Stolz V, et al. *NCOR1*—a new player on the field of T cell development. *J Leukoc Biol*. 2018;104:1061–1068.
- [191] Chiba S. Dysregulation of *TET2* in hematologic malignancies. *Int J Hematol*. 2017;105:17–22.
- [192] Weissmann S, Alpermann T, Grossmann V, et al. Landscape of *TET2* mutations in acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 2012;26:934–942.
- [193] Papaemmanuil E, Gerstung M, Bullinger L, et al. Genomic Classification and Prognosis in Acute Myeloid Leukemia. *N Engl J Med*. 2016;374:2209–2221.
- [194] Peng J, Zuo Z, Fu B, et al. Chronic myelomonocytic leukemia with nucleophosmin (NPM1) mutation. *Eur J Haematol*. 2016;96:65–71.
- [195] Papaemmanuil E, Consortium on behalf of the CMD working group of the ICG, Gerstung M, et al. Clinical and biological implications of driver mutations in myelodysplastic syndromes. *Blood*. 2013;122:3616–3627.
- [196] Zehir A, Benayed R, Shah RH, et al. Mutational landscape of metastatic cancer revealed from prospective clinical sequencing of 10,000 patients. *Nat Med*. 2017;23:703–713.
- [197] Kim B, Won D, Lee S-T, et al. Somatic mosaic truncating mutations of PPM1D in blood can result from expansion of a mutant clone under selective pressure of chemotherapy. *PLOS ONE*. 2019;14:e0217521.

- [198] Leibundgut EO, Haubitz M, Burington B, et al. Dynamics of mutations in patients with essential thrombocythemia treated with imetelstat. *Haematologica*. 2020 Jul 30 (en prensa).
- [199] Fried I, Bodner C, Pichler MM, et al. Frequency, onset and clinical impact of somatic DNMT3A mutations in therapy-related and secondary acute myeloid leukemia. *Haematologica*. 2012;97:246–250.
- [200] Ross JS, Gay LM, Wang K, et al. Nonamplification ERBB2 genomic alterations in 5605 cases of recurrent and metastatic breast cancer: An emerging opportunity for anti-HER2 targeted therapies. *Cancer*. 2016;122:2654–2662.
- [201] Pillonel V, Juskevicius D, Ng CKY, et al. High-throughput sequencing of nodal marginal zone lymphomas identifies recurrent BRAF mutations. *Leukemia*. 2018;32:2412–2426.
- [202] Couronné L, Bastard C, Bernard OA. TET2 and DNMT3A mutations in human T-cell lymphoma. *N Engl J Med*. 2012;366:95–96.
- [203] Odejide O, Weigert O, Lane AA, et al. A targeted mutational landscape of angioimmunoblastic T-cell lymphoma. *Blood*. 2014;123:1293–1296.
- [204] Shih AH, Abdel-Wahab O, Patel JP, et al. The role of mutations in epigenetic regulators in myeloid malignancies. *Nat Rev Cancer*. 2012;12:599–612.
- [205] Fang S, Krahe R, Lozano G, et al. Effects of MDM2, MDM4 and TP53 codon 72 polymorphisms on cancer risk in a cohort study of carriers of TP53 germline mutations. *PloS One*. 2010;5:e10813.
- [206] Dumont P, Leu JI-J, Della Pietra AC, et al. The codon 72 polymorphic variants of p53 have markedly different apoptotic potential. *Nat Genet*. 2003;33:357–365.
- [207] Antoun S, Atallah D, Tahtouh R, et al. Different TP53 mutants in p53

overexpressed epithelial ovarian carcinoma can be associated both with altered and unaltered glycolytic and apoptotic profiles. *Cancer Cell Int.* 2018;18:14.

[208] Barnoud T, Parris JLD, Murphy ME. Tumor cells containing the African-Centric S47 variant of TP53 show increased Warburg metabolism. *Oncotarget.* 2019;10:1217–1223.

[209] Leitaó MM, Soslow RA, Baergen RN, et al. Mutation and expression of the TP53 gene in early stage epithelial ovarian carcinoma. *Gynecol Oncol.* 2004;93:301–306.

[210] Madi A, Fisher D, Maughan TS, et al. Comprehensive pharmacogenetic profiling of the epidermal growth factor receptor pathway for biomarkers of response to, and toxicity from, cetuximab. *J Med Genet.* 2017;54:567–571.

[211] Patiño LC, Battu R, Ortega-Recalde O, et al. Exome sequencing is an efficient tool for variant late-infantile neuronal ceroid lipofuscinosis molecular diagnosis. *PLOS ONE.* 2014;9:e109576.

[212] Manso R, González-Rincón J, Rodríguez-Justo M, et al. Overlap at the molecular and immunohistochemical levels between angioimmunoblastic T-cell lymphoma and a subgroup of peripheral T-cell lymphomas without specific morphological features. *Oncotarget.* 2018;9:16124–16133.

[213] Vaqué JP, Gómez-López G, Monsálvez V, et al. PLCG1 mutations in cutaneous T-cell lymphomas. *Blood.* 2014;123:2034–2043.

[214] Hientz K, Mohr A, Bhakta-Guha D, et al. The role of p53 in cancer drug resistance and targeted chemotherapy. *Oncotarget.* 2016;8:8921–8946.

[215] Bergamaschi D, Gasco M, Hiller L, et al. p53 polymorphism influences response in cancer chemotherapy via modulation of p73-dependent apoptosis. *Cancer Cell.* 2003;3:387–402.

[216] Saillard C, Guermouche H, Derrieux C, et al. Response to 5-azacytidine

in a patient with TET2-mutated angioimmunoblastic T-cell lymphoma and chronic myelomonocytic leukaemia preceded by an EBV-positive large B-cell lymphoma. *Hematol Oncol.* 2017;35:864–868.

[217] Rugo HS, Jacobs I, Sharma S, et al. The promise for histone methyltransferase inhibitors for epigenetic therapy in clinical oncology: a narrative review. *Adv Ther.* 2020;37:3059–3082.

[218] Li L, Wu C, Chai Y, et al. Chidamide induces long-term remission in rare subcutaneous panniculitis-like T-cell lymphoma: An unusual case report and literature review. *Int J Immunopathol Pharmacol.* 2021;35:20587384211009344.

Artículo que compone el núcleo central de la tesis:

Título: Subcutaneous panniculitis-like T-cell lymphoma, lupus erythematosus profundus and overlapping cases: molecular characterization through the study of 208 genes

Autores: Salma Machan, Marta Rodríguez, Ruth Alonso-Alonso, Rebeca Manso, José Luis Rodríguez-Peralto, Lorenzo Cerroni, Rosario Haro, Candelaria García, Enrique García Toro, Teresa Estrach, Adriana García-Herrera, Berta Ferrer, Carlos González-Cruz, Nerea Segues, Juan Luis Afonso-Martin, Yeray Peñate, Carlos Monteagudo, Miguel Ángel Limeres-Gonzalez, María Ángeles González-Núñez, Ángeles Torres, Laura Cereceda-Company, Raúl Córdoba, Miguel Ángel Piris, Luis Requena, Socorro María Rodríguez-Pinilla.

Revista: Leukemia & Lymphoma

DOI: [10.1080/10428194.2021.1901098](https://doi.org/10.1080/10428194.2021.1901098)

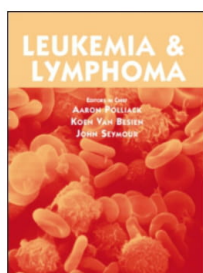
PMID: 33966586

Enlace:

<https://www.tandfonline.com/eprint/SEYEDYBQIBAS4RGVTIES/full?target=10.1080/10428194.2021.1901098>

ANEXOS

ANEXO 1. ARTÍCULO ORIGINAL



Leukemia & Lymphoma

ISSN: (Print) (Online) Journal homepage: <https://www.tandfonline.com/loi/ilal20>

Subcutaneous panniculitis-like T-cell lymphoma, lupus erythematosus profundus, and overlapping cases: molecular characterization through the study of 208 genes

Salma Machan, Marta Rodríguez, Ruth Alonso-Alonso, Rebeca Manso, Sandra Pérez-Buira, Jennifer Borregón, José Luis Rodríguez-Peralto, Lorenzo Cerroni, Rosario Haro, Candelaria García, Enrique García Toro, Teresa Estrach, Adriana García-Herrera, Berta Ferrer, Carlos González-Cruz, Nerea Segues, Juan Luis Afonso-Martin, Yeray Peñate, Carlos Monteagudo, Miguel Ángel Limeres-Gonzalez, María Ángeles González-Núñez, María Ángeles Torres-Nieto Torres, Laura Cereceda, Raúl Córdoba, Miguel Ángel Piris, Luis Requena & Socorro María Rodríguez-Pinilla

To cite this article: Salma Machan, Marta Rodríguez, Ruth Alonso-Alonso, Rebeca Manso, Sandra Pérez-Buira, Jennifer Borregón, José Luis Rodríguez-Peralto, Lorenzo Cerroni, Rosario Haro, Candelaria García, Enrique García Toro, Teresa Estrach, Adriana García-Herrera, Berta Ferrer, Carlos González-Cruz, Nerea Segues, Juan Luis Afonso-Martin, Yeray Peñate, Carlos Monteagudo, Miguel Ángel Limeres-Gonzalez, María Ángeles González-Núñez, María Ángeles Torres-Nieto Torres, Laura Cereceda, Raúl Córdoba, Miguel Ángel Piris, Luis Requena & Socorro María Rodríguez-Pinilla (2021): Subcutaneous panniculitis-like T-cell lymphoma, lupus erythematosus profundus, and overlapping cases: molecular characterization through the study of 208 genes, *Leukemia & Lymphoma*, DOI: [10.1080/10428194.2021.1901098](https://doi.org/10.1080/10428194.2021.1901098)

To link to this article: <https://doi.org/10.1080/10428194.2021.1901098>

[View supplementary material](#)

Published online: 08 May 2021.




[Submit your article to this journal](#)[View related articles](#)[View Crossmark data](#)

Full Terms & Conditions of access and use can be found at
<https://www.tandfonline.com/action/journalInformation?journalCode=ilal20>

ORIGINAL ARTICLE



Subcutaneous panniculitis-like T-cell lymphoma, lupus erythematosus profundus, and overlapping cases: molecular characterization through the study of 208 genes

Salma Machan^a , Marta Rodríguez^{b,c}, Ruth Alonso-Alonso^{b,c}, Rebeca Manso^{b,c}, Sandra Pérez-Buira^{b,c}, Jennifer Borregón^{b,c}, José Luis Rodríguez-Peralto^d, Lorenzo Cerroni^e, Rosario Haro^a, Candelaria García^f, Enrique García Toro^g, Teresa Estrach^h, Adriana García-Herrera^h, Berta Ferrerⁱ, Carlos González-Cruzⁱ, Nerea Segues^j , Juan Luis Afonso-Martin^k, Yeray Peñate^k, Carlos Monteagudo^l, Miguel Ángel Limeres-Gonzalez^m, María Ángeles González-Núñezⁿ, María Ángeles Torres-Nieto Torres^o , Laura Cereceda^{b,c}, Raúl Córdoba^p, Miguel Ángel Piris^{b,c}, Luis Requena^a and Socorro María Rodríguez-Pinilla^{b,c}

^aDepartment of Dermatology, Fundación Jiménez Díaz, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, Spain; ^bDepartment of Pathology, Fundación Jiménez Díaz, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, Spain; ^cCIBERONC (Centro de Investigación Biomédica en Red de Cáncer), Madrid, Spain; ^dHospital Universitario 12 de Octubre, Madrid, Spain; ^eDepartment of Dermatology, Dermatopathology Research Unit, Medical University of Graz, Graz, Austria; ^fHospital Universitario de Canarias, Tenerife, Spain; ^gHospital Universitario de Burgos, Burgos, Spain; ^hHospital Clínic de Barcelona, Barcelona, Spain; ⁱHospital Vall d'Hebron, Barcelona, Spain; ^jHospital Universitario Donostia, San Sebastián, Spain; ^kComplejo Hospitalario Universitario Insular Materno-Infantil, Las Palmas de Gran Canaria, Spain; ^lHospital Clínico Universitario de Valencia, Universidad de Valencia, Valencia, Spain; ^mHospital Universitario de Gran Canaria Doctor Negrín, Las Palmas de Gran Canaria, Spain; ⁿHospital Ciudad de Coria y Hospital San Pedro de Alcántara, Cáceres, Spain; ^oHospital Universitario Río Hortega, Valladolid, Spain; ^pDepartment of Hematology, Fundación Jiménez Díaz, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, Spain

ABSTRACT

Subcutaneous panniculitis-like T-cell lymphoma (SPTCL) is a rare cytotoxic cutaneous lymphoma. Differential diagnosis with lupus erythematosus panniculitis (LEP) can be challenging and overlapping cases have been described. In this study, we investigate whether gene expression profiling may or not identify markers that can be used to improve our understanding of the disease and to make a precise differential diagnosis. SPTCL, LEP, and overlapping cases were analyzed using a customized NanoString platform including 208 genes related to T-cell differentiation, stromal signatures, oncogenes, and tumor suppressor genes. Gene expression unsupervised analysis of the samples differentiated SPTCL from LEP samples. Most overlapping cases were clustered with LEP cases. Differentially expressed genes were observed when comparing SPTCL with LEP cases; and overlapping with LEP cases. Gene set enrichment analysis recognized gene sets defining each group. In conclusion, SPTCL and LEP have distinctive molecular profiles and the molecular background of overlapping cases more closely resembles LEP.

ARTICLE HISTORY

Received 26 October 2020
 Accepted 1 March 2021

KEYWORDS

Cutaneous lymphomas;
 T-cell lymphoma;
 subcutaneous panniculitis-like T-cell lymphoma; lupus erythematosus; lupus erythematosus panniculitis; gene expression profiling

Introduction

Subcutaneous panniculitis-like T-cell lymphoma (SPTCL) is a rare cytotoxic T-cell cutaneous lymphoma, with mostly indolent behavior. However, its association with hemophagocytic syndrome (HPS) may worsen the prognosis. Up to 20% of patients with SPTCL may have an associated autoimmune disease, most frequently systemic lupus erythematosus (SLE). Differential diagnosis of SPTCL with lupus erythematosus panniculitis (LEP), also known as lupus profundus,

is usually straightforward (Table S1), but overlapping cases that are difficult to categorize do occur [1–6].

Few molecular studies of SPTCL cases have been performed. Comparative genomic hybridization has revealed a distinctive profile of losses and gains [7], and germline and somatic mutations have been reported [8–12]. There is only one previously published gene expression profiling study, describing four cases of SPTCL, in which *IDO-1* (indoleamine 2,3-dioxygenase), an immunotolerance-inducing enzyme, and Th1-specific genes were found to be overexpressed [13].

The aim of our study was to investigate whether a gene expression profiling study using a customized NanoString platform may or not identify markers that are helpful for differential diagnosis among SPTCL, LEP, and overlapping cases and to improve our knowledge of the molecular background of these disorders.

Materials and methods

Patient samples

We analyzed 22 cases, including SPTCL (eight cases), LEP (nine cases), and overlapping cases (five cases) that were retrieved from the files of our centers in Spain and Austria. Some of the cases were recovered from the Spanish Registry of Cutaneous Lymphomas (RELC, *Registro Español de Linfomas Cutáneos*) [14]. In all cases, the diagnosis of SPTCL was established in accordance with the criteria listed in the World Health Organization (WHO) classification of cutaneous lymphoma (Table S1) [15]. Overlapping cases were defined by the presence of histopathologic features of SPTCL (rimming of adipocytes by atypical CD8+ lymphocytes with high proliferative index) and features of LEP (interface dermatitis, interstitial mucin, lymphocytes, and plasma cells in the fat lobule, lymphoid aggregates of B-cells and clusters of CD123+ plasmacytoid dendritic cells) in the same biopsy specimen or in subsequent samples [1,6]. Initially, 41 cases were collected but 19 cases were excluded from the study because of the low quality and quantity of the RNA extracted. When available, clinical and follow-up data were obtained from the referring physicians. Partial clinicopathologic data of three of the cases have been previously published [1].

Sample collection and processing

RNA was isolated from formalin-fixed, paraffin-embedded (FFPE) diagnostic tissue biopsies. Total RNA was extracted with an RNeasy FFPE Kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions. RNA quality and quantity were assessed with an RNA 6000 Nano kit (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) using the Agilent 2100 Bioanalyzer System (Agilent Technologies, Santa Clara, CA). The samples were immunohistochemically stained for CD3, CD4, CD8, CD20, TCR beta, TCR gamma, Ki67, EBER, and CD123 (Table S2).

PCR for TCR gene rearrangement

We extracted genomic DNA (DNAg) of tumoral FFPE samples using a DNA Sample Preparation kit (Roche, Basel, Switzerland) in accordance with the manufacturer's protocol. DNAs were quantified with Qubit® (Invitrogen, Carlsbad, CA). PCR was performed to analyze the clonal expansion of T-cells. DNA was extracted from paraffin sections and T-cell clonal expansion was detected by PCR for the TCRβ (Vβ –Jβ and Dβ –Jβ) and TCRγ (VγJγ) chain gene rearrangement [16]. Appropriate positive and negative controls were included in all experiments. Clonality was assayed following well-established recommendations [17].

NanoString LST nCounter gene-expression assay

Gene-expression profiling was performed with the Research Use Only Version of the NanoString LST assay (customized 208-gene panel) in conjunction with eight housekeeping gene probes. The protocol used for the NanoString LST gene expression assay has been described previously [18]. The analysis was designed to include genes expressed by the different components of the stroma and neoplastic cells, and genes known to be therapeutic targets. Briefly, 208 genes and eight housekeeping gene probes were hybridized to 400 ng of total RNA for 16 h at 65 °C. Automated removal of excess probe and immobilization of probe–transcript complexes on a streptavidin-coated cartridge were carried out in an nCounter Preparation Station. The data were analyzed using nSolver™ Analysis Software version 4.0 (NanoString Technologies, Seattle, WA).

Gene set enrichment analysis

Gene set enrichment analysis (GSEA) [19] was performed. Functional enrichment was applied using annotations from the NanoString Custom Panel, MsigDB, Reactome, KEGG, and NCI databases. Genes were ranked based on the Limma moderated and ordinary t-statistics. After Kolmogorov–Smirnov testing, those gene sets showing FDR < 0.05 were considered enriched between classes under comparison.

Statistical analysis

Student's unpaired samples t-test was used to evaluate the association of both diseases (SPTCL and LEP) with the expression of the 208 genes evaluated. A value of $p \leq .05$ was applied for calling differentially expressed genes (DEGs). A false discovery rate (FDR)

cutoff of ≤ 0.25 was significant for pathway analysis (Table S3) by GSEA, a powerful analytical method (Broad Institute, Cambridge, MA). Heatmaps were produced using the Morpheus web tool (Broad Institute, Cambridge, MA).

Immunohistochemistry validation

Eighteen additional FFPE cases (nine SPTCL, eight LEP, and one overlapping case) were stained by the Endvision method with a heat-induced antigen-retrieval step for PD-1, perforin, T-bet, and Tryptase (Table S4). Cases were considered positive when more than 5% of the cells showed immunoreactivity. Cases were scored quantitatively as 0 (including negative and $\leq 5\%$ of positivity), 1 ($>5\%$ and $<30\%$ of positivity), and 2 ($\geq 30\%$ of positivity). Evaluation of all these markers was done separately in either neoplastic or bystander cells by a pathologist (SMRP) and a dermatopathologist (LR) at a $\times 20$ magnification. The pattern of positivity was also highlighted in each case.

RNA extraction, reverse transcription, and quantitative real-time PCR

RNA was isolated from FFPE diagnostic tissue biopsies. Total RNA was extracted with an RNeasy FFPE Kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions. RNA quality and quantity were assessed with an RNA 6000 Nano kit (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) using the Agilent 2100 Bioanalyzer System (Agilent Technologies, Santa Clara, CA).

For cDNA synthesis, random hexamers were used as primers and RNA retro-transcribed with the Transcription First-Strand cDNA Synthesis Kit (Roche Holding AG, Basel, Switzerland).

Quantitative real-time PCR (qRT-PCR) cDNA amplification was performed in a LightCycler 480 system using the LightCycler 480 SYBR Green I Master Kit (Roche Holding AG, Basel, Switzerland) for *EOMES*, *PRF1*, *IL10*, *CCL13*, and *LAG3*. Thermal cycling for all genes was initiated with a denaturing step at 95°C for 10 min and then subjected to 45 cycles of PCR (denaturing at 95°C for 15 s, annealing at 60°C for 20 s, and elongation at 72°C for 10 s, in which fluorescence was acquired). At the end of the PCR cycles, melting curve analyses were conducted, followed by sequencing, to validate the generation of the specific PCR product expected. Primer sets for *EOMES*, *PRF1*, *IL10*, *CCL13*, and *LAG3* have been described in Table S5. Relative gene expression was calculated according to the comparative cycle threshold (Ct) method [20]. Expression of *ATP5E* was used for

normalization, and results were plotted as relative mRNA expression levels normalized to the internal control.

Results

Clinical findings are summarized in Table 1. Briefly, seven of the eight SPTCL cases were female, and one was male. The mean age at diagnosis was 45 years (range 23–69 years). The cutaneous lesions consisted of multiple (5/8) or solitary (3/8) plaques or nodules that were located on the upper extremities (4/8), the lower extremities (2/8), the trunk (3/8), and the face (1/8). Two patients presented an associated autoimmune disease (rheumatoid arthritis and multiple sclerosis). Two patients with SPTCL presented HPS. Five patients were treated with immunomodulators (prednisone \pm cyclosporine) and one with polychemotherapy. One patient died due to another unrelated disease before treatment began, and another patient with HPS died because of lymphoma 18 months after diagnosis. The remaining patients were alive with (3/8) or without disease (3/8) after a follow-up time of 6–86 months. The immunophenotype of the SPTCL cases is shown in Table S6.

Nine patients with LEP were analyzed, all of them were female. The mean age at diagnosis was 55.7 years (range 38–67 years). No other clinical data were available for one case. Only one case of LEP associated with SLE presented HPS. Multiple (6/8) or solitary (2/8) plaques or nodules, which were ulcerated in three cases, were located on the lower extremities (6/8), the upper extremities (5/8), the trunk (2/8), and the face (1/8). Four patients fulfilled the criteria for a diagnosis of SLE, or their condition overlapped with the features of Sjögren syndrome, scleroderma, or dermatomyositis. LEP patients received treatment mostly with prednisone and/or antimalarials (6/8). One patient received additional treatment with methotrexate, and another one was treated with leflunomide, intravenous immunoglobulins, azathioprine, tacrolimus, belimumab, sulfone, and thalidomide, but died after 96 months of follow-up. All other patients with LEP were alive, with (6/8) or without disease (1/8), at their last follow-up (range 23–217 months) before data were compiled for this article.

Five cases presented overlapping histopathological features of LEP and SPTCL, four of them were female, and one was male. The mean age at diagnosis was 24.8 years (range 11–36 years). Multiple plaques or nodules of LEP were located on the arms (3/5), trunk (2/5), face (2/5), and lower extremities (1/5). None of the overlapping cases presented HPS. Treatments provided comprised steroids, methotrexate, antimalarials,

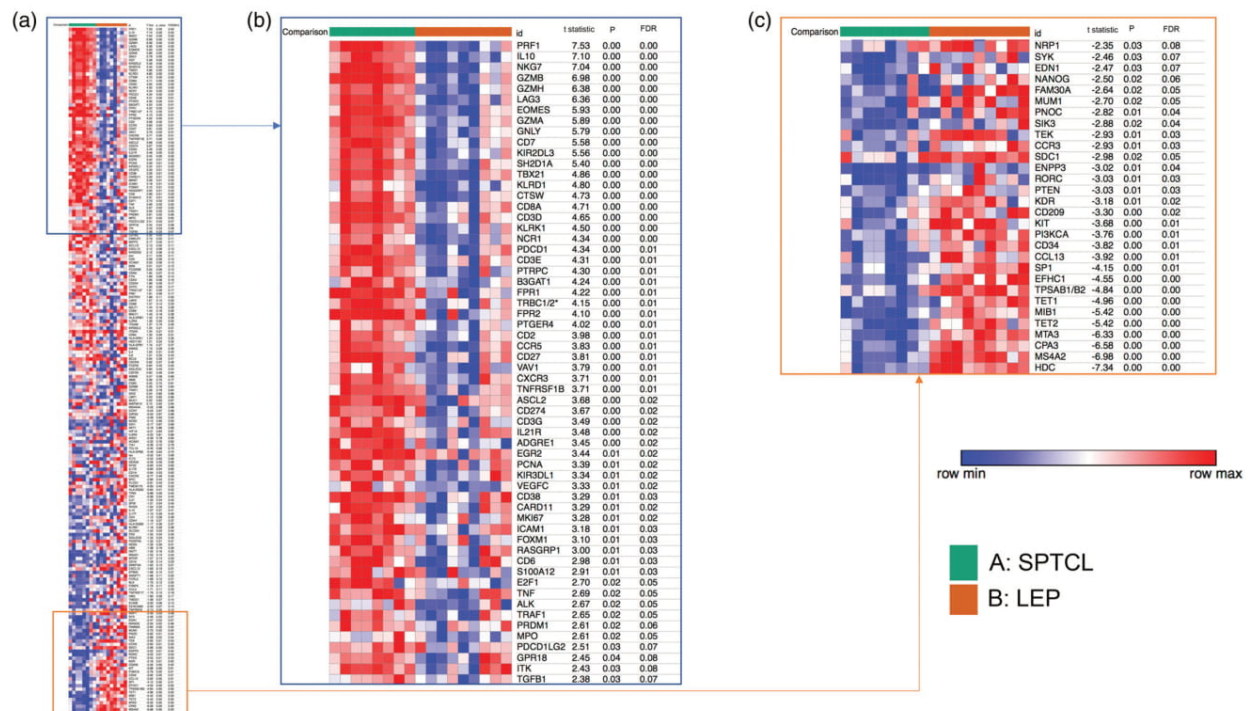


Figure 2. (a) Heatmap of supervised analysis comparing subcutaneous panniculitis-like T-cell lymphoma (SPTCL, A) and lupus erythematosus panniculitis (LEP, B) showing 60 upregulated genes (upper square) and 30 downregulated genes (lower square). (b) Table showing the most significant upregulated and downregulated genes in SPTCL.

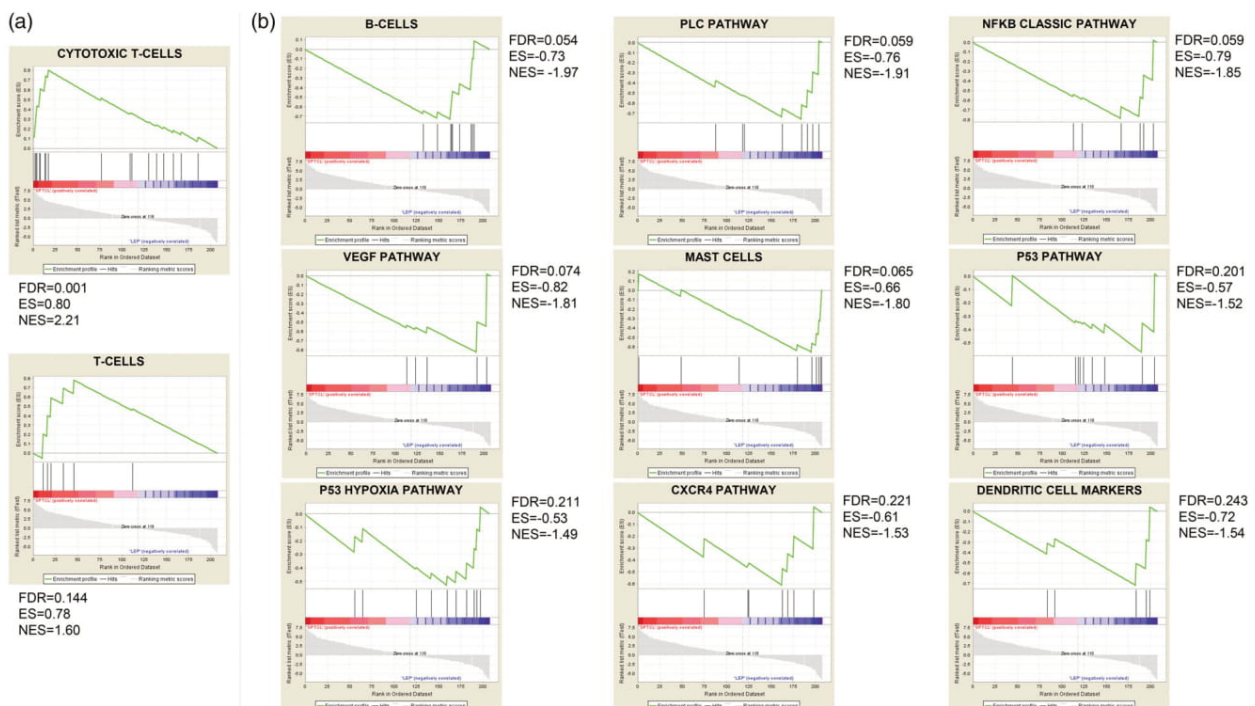


Figure 3. Gene set enrichment analysis revealing the most important pathways in subcutaneous panniculitis-like T-cell lymphoma (a) and lupus erythematosus panniculitis (b).

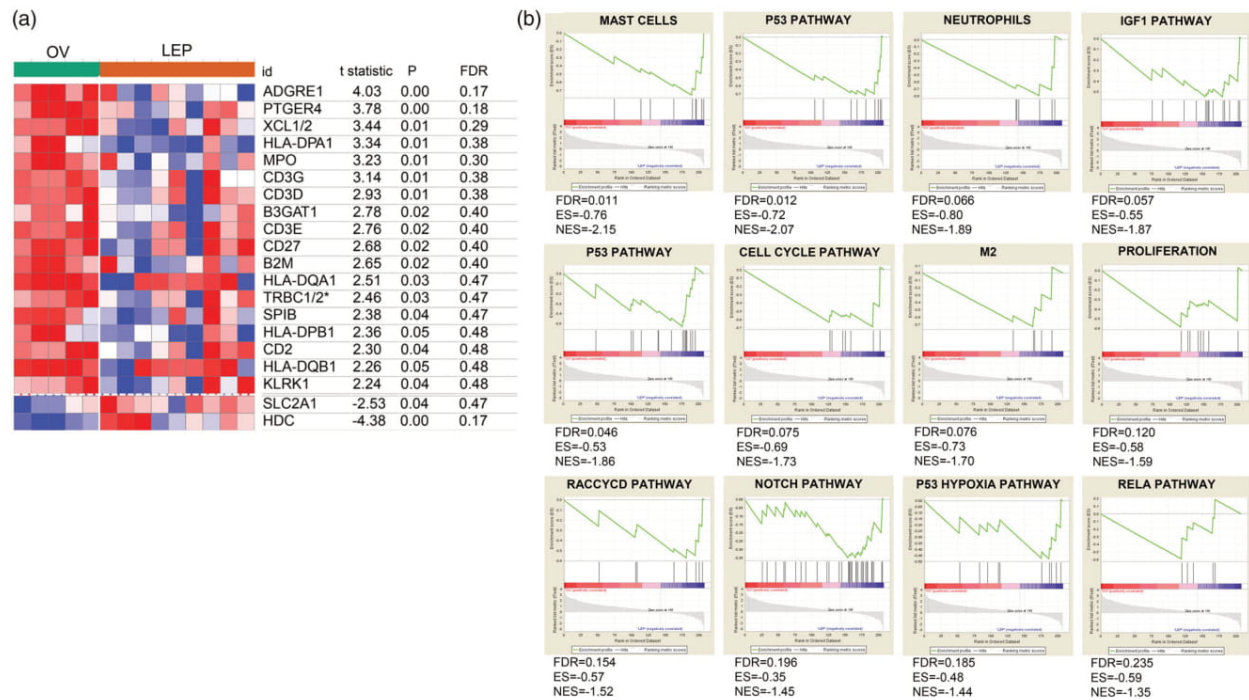


Figure 4. (a) Heatmap comparing overlapping cases and lupus erythematosus panniculitis. (b) Gene set enrichment analysis (GSEA) showing T-cell pathways of importance in overlapping cases compared with in LEP cases.

autologous stem cell transplantation, all patients achieving complete or partial response. All patients were alive, with or without disease, after 12–146 months of follow-up.

The results of gene expression profiling studies are shown in Figures 1–4. The hierarchical unsupervised analysis including all the cases revealed that all SPTCL cases were grouped together, whereas LEP cases were clustered in two groups, one independent and the other one closer molecularly to the SPTCL cases. Four of the five overlapping cases were grouped with the LEP cases and the fifth case was clustered with SPTCL (Figure 1). When performing a supervised analysis to compare SPTCL with LEP, excluding the overlapping cases, we found 90 DEGs. Sixty and 30 genes were upregulated and downregulated, respectively. The ‘top 20’ DEGs in SPTCL comprised genes that have been related to cytotoxicity (*PRF1*, *NKG7*, *GZMB*, *GZMH*, *GZMA*, *GNLY*, *KLRD1*, *CTSW*, *CD8A*, *KLRK1*, *NCR1*), exhaustion of CD8⁺ cells (*IL10*, *LAG3*, *EOMES*, *TBX21*, *PDCD1*), T-cell genes (*CD7*, *SH2D1A*, *CD3D*), and KIR2DL3 (inhibitory transmembrane protein). We found that the most relevant differentially downregulated genes were those related to mast cells (*HDC*, *CPA3*, *MTA3*, *TPSAB1/B2*, *KIT*, *ENPP3*), B-cells (*KDR*), T-cell lymphoma (*TET2*, *TET1*), apoptosis (*MIB1*, *EFHC1*), dendritic cells (*SP1*, *CCL3*, *CD209*), and the PI3K/AKT/mTOR pathway (*PI3KCA*, *PTEN*) (Figure 2). Further implication

of these genes in other pathways is detailed in Table S3.

GSEA revealed that genes involved in cytotoxic T-cells (*PRF1*, *KLRD1*, *GZMA*, *NKG7*, *GZMB*, *KLRK1*, *GNLY*, *GZMH*, *CTSW*) and T-cells pathways (*SH2D1A*, *CD3D*, *CD3E*, *CD3G*, *CD6*) were frequent in the SPTCL subgroup; and those related to B-cells (*SDC1*, *FAM30A*, *PNOC*, *TNFRSF17*, *MS4A1*, *BLK*, *CD19*, *SPIB*), PLC (*MS4A2*, *PI3KCA*, *PTEN*, *SIK3*, *MTOR*), NF- κ B (*TET2*, *TET1*, *FAM30A*, *CEACAM3*), VEGF (*TET2*, *TET1*, *NT5E*, *IDH1*), mast cells (*CPA3*, *HDC*, *TPSAB1/B2*, *KIT*, *ENPP3*), p53 (*MS4A2*, *SDC1*, *TP53*), p53-hypoxia (*PI3KCA*, *KDR*, *SDC1*, *TEK*, *ANGPT1*, *PPGFRA*), CXCR4 (*CD34*, *NANOG*, *CXCL12*, *MTOR*), and dendritic cells pathways (*CCL13*, *CD209*, *EDN1*) were of particular note in the LEP group (Figure 3).

We compared gene expression of overlapping cases with LEP cases and found that 19 genes were upregulated (*ADGRE1*, *PTGER4*, *XCL1/2*, *HLA-DPA1*, *MPO*, *CD3G*, *CD3D*, *B3GAT1*, *CD3E*, *CD27*, *B2M*, *HLA-DQA1*, *TRBC1/2*, *SPIB*, *CD2*, *KLRK1*) and two genes were downregulated (*HDC* and *SLC2A1*). GSEA identified no relevant pathways in overlapping cases when compared with LEP; the relevant pathways in LEP were those related to mast cells (*HDC*, *CPA3*, *TPSAB1/B2*, *MS4A2*, *KIT*), p53 (*SDC1*, *MUC1*, *TP53*, *MS4A2*, *GATA3*, *AKT1*, *FOM1*), neutrophils (*CEACAM3*, *FCAR*, *CSF3R*, *FCGR3B*; *S100A12*, *SIGLEC5*), IGF1 (*SDC1*, *MUC1*, *KIT*, *CCR3*, *BZLF1*, *IL13*,

FOXM1, *RNASE3*, *IL6*, *TNFRSF8*), G1 (*MS4A2*, *CCR3*, *BZLF1*, *NT5E*, *RORC*), cell cycle (*MIB1*, *MYC*, *PCNA*, *CDK2*, *MKI67*, *CDK4*, *CDK6*), macrophages M2 (*MYC*, *TGFB1*, *IL13*, *EGR2*), proliferation (*MIB1*, *PCNA*, *CDK2*, *MKI67*, *DNTT*, *CDK4*, *CDK6*, *E2F1*), *RACCYCD* (*SDC1*, *TP63*, *MS4A2*, *GATA3*), *NOTCH* (*SLC2A1*, *SDC1*, *FCAR*, *MYC*, *KIT*, *IL17F*, *CCR3*, *BZLF1*, *RORC*, *TGFB1*, *EDN1*, *AKT1*, *TMOD1*, *IL13*, *FOXM1*, *RNASE3*, *IL6*, *IKBKB*, *TNFRSF8*), p53-hypoxia (*SDC1*, *PGFR4*, *MYC*, *HIF1A*, *TGFB1*), and *RELA* (*AKT1*, *IL13*, *tax*, *ENPP3*, *env*) pathways (Figure 4). However, there were no statistically significant differences in the other pathways analyzed (MHC-II, *RAC1*, *BLIMP-1*, CD8 T-cell differentiation, CD40 signaling during germinal center (GC) development, cytotoxicity, PI3K pathway, *Bcl6* targets, T-cell lymphoma genes, *RHOA*, T-cell cytokine signaling, MHC-I, GC-B-cells, eosinophils, monocytes, *STAT3*, TCR, B-cells, *VEGF*, *MTOR*, GC-T-helper cell, *GSK3*, vascular TGF- β , homeobox, *CXCR4*, PLC, phosphatidyl inositol signaling system, Toll, regulatory T-cells, B-cell-T-cell, M0, stemness, MAPK, DC, NFKB classic).

GYPC and *S100A12* were overexpressed in SPTCL cases with HPS compared with SPTCL cases without HPS (data not shown).

To validate the genes differentially expressed between SPTCL and LEP by NanoString technology, both quantitative RT-PCR and immunohistochemistry

(IHC) were used on a new patient set of nine SPTCL, eight LEP, and one overlapping case. *EOMES*, *PRF1*, *IL10*, *CCL13*, and *LAG3* genes were studied using RT-PCR and *ATP5E* gene was used for normalization of RT-PCR. The level of *PRF1* and *EOMES* genes was significantly ($p < .05$) increased in the SPTCL group compared to the LEP group and the overlapping group (Figure S1).

Immunohistochemically, PD1, perforin, and T-bet showed an intense staining in most neoplastic T-cells rimming the adipocytes of SPTCL (Figure 5). However, PD1 expression was seen in follicular helper T lymphocytes of GCs of LEP cases. Perforin and T-bet were positive in the few T-cells found in the septa and those located in the dermis of LEP. Tryptase was found in both conditions, mainly in the dermis. Interestingly mastocytes seemed to show an elongated morphology in SPTCL cases, while there were round in LEP.

Discussion

This study evaluated the gene expression profile of SPTCL and LEP and the potential diagnostic utility of selected markers for differential diagnosis between these two entities. We observed distinctive molecular signatures of SPTCL and LEP with 90 genes differentially expressed that suggest particular biological

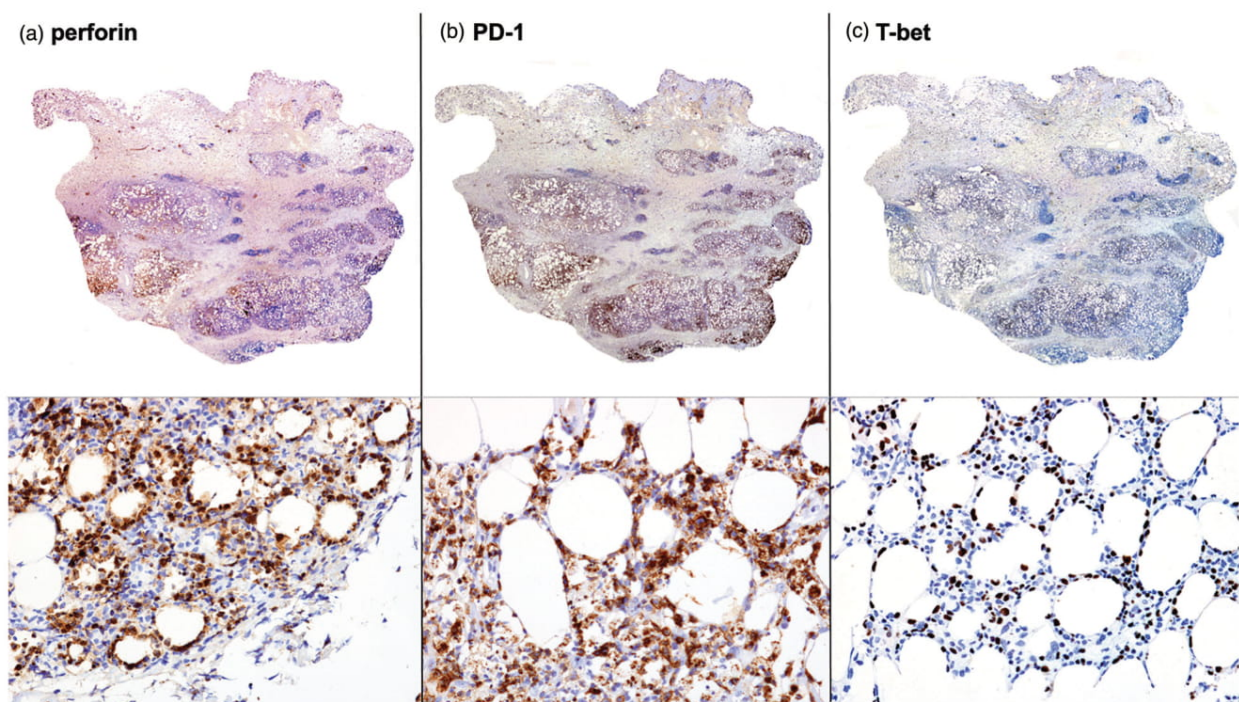


Figure 5. Immunohistochemical validation of SPTCL cases. (a) Perforin staining showing lobular infiltrate positivity in the panoramic view. In detail, perforin positive neoplastic cells rimming the adipocytes. (b) PD-1 positivity of the lobular infiltrate. In detail, positive neoplastic cells rimming the adipocytes and between the adipocytes. (c) T-bet positivity of the lobular infiltrate. In detail, positive cells rimming the adipocytes and between the adipocytes.

backgrounds for the two entities. However, a subgroup of LEP shared some gene expression with SPTCL, suggesting a possible common molecular background of SPTCL and LEP, as it has been previously suggested [13].

Among the overexpressed genes, we selected *PRF1*, *TBX21*, *PDCD1*, *TPSAB1/B2*, *EOMES*, *CCL13*, *IL10*, and *LAG3* to be validated either by RT-PCR or IHC. Immunohistochemically, positivity for PD-1 (encoded by *PDCD1*), T-bet (encoded by *TBX21*), and perforin (encoded by *PRF1*) of the neoplastic T-cells rimming the adipocytes was observed. Perforin positivity has been previously described in SPTCL [21,22] and is a routine diagnostic marker. However, we found only one previous study showing PD-1 positivity in 4/7 SPTCL samples [23]. To the best of our knowledge, T-bet and Tryptase have not been studied before in SPTCL. By means of RT-PCR, *PRF1* and *EOMES* were validated in our study.

Both T-box transcription factors T-bet and eomesodermin (Eomes), which are important regulators of cytotoxic lymphocytes [24], were overexpressed in our SPTCL cases. *TBX21* is a lineage-defining transcription factor which initiates Th1 lineage development from naive Th precursor cells, both by activating Th1 genetic programs and by repressing the opposing Th2 and Th17 genetic programs [25]. It activates transcription of a Th1-related set of genes, including those encoding IFN-gamma and the chemokine receptor CXCR3. In our study, we found T-bet positivity in the neoplastic cells rimming adipocytes of SPTCL (Figure 5). In line with these findings, a previous study has shown upregulation of Th1-specific cytokines genes in SPTCL samples compared with normal fat and erythema nodosum [13]. In the later, CD8+ malignant cells rimming adipocytes expressed CXCR3 (the target protein of TBX21) [13]. In our cases, *CXCR3* gene was overexpressed. It is worth noting that our comparative group consisted of a type of cutaneous LE that has an enhanced type 1 immune response [26]. T-bet expression has been previously studied in some cutaneous T-cell lymphomas other than SPTCL and high T-bet expression has been found in early stage-MF (patch and plaque stages). However, advanced stage-MF (tumors), Sézary syndrome, and cutaneous anaplastic large cell lymphoma were negative for T-bet [27]. Concerning peripheral T-cell lymphoma (PTCL), a good prognosis PTCL-TBX21 subgroup has been defined [28]. In addition, the immunohistochemical expression of cytotoxic markers (TIA-1 and/or granzyme B) has been more frequently associated with PTCL-TBX21 compared with PTCL-GATA3, including the CD8+ cytotoxic phenotype [29].

It has been proposed that Eomes may be necessary for full effector differentiation of CD8+ T cells [30], mainly via the induction of the cytolytic gene perforin [31]. In addition, *EOMES* is one of the exhausted CD8 T-cell-related genes, along with *TBX21*, *PDCD1*, *LAG3*, and *PTGER4*, that were overexpressed in the SPTCL group in our study. However, *LAG3* reached no significance for validation by RT-PCR. This group of genes has been associated with a more advanced stage (T3 or T4) of other primary cutaneous T-cell lymphomas (i.e. mycosis fungoides/Sézary syndrome) [32]. In any case, it is also possible that the expression of this cluster of genes has different biological roles in CD4 and CD8 neoplastic T-cells.

PD-1 is an inhibitory receptor on antigen activated T-cells that plays a critical role in induction and maintenance of immune tolerance to self [33]. It delivers inhibitory signals upon binding to ligands CD274/PDCD1L1 and CD273/PDCD1LG2. *PD-1* and both ligands genes were overexpressed in our SPTCL cases. Immunohistochemically, PD-1 was expressed in the neoplastic lymphocytes rimming the adipocytes of SPTCL cases.

We found upregulation of T-cell cytotoxicity genes in SPTCL compared with LEP ($p < .01$), as expected. This finding is similar to that of a previous study of SPTCL using gene expression microarrays [13]. It is worth noting that previous studies in the lymphocytic infiltrate of cutaneous lupus erythematosus (LE) have shown overexpression of genes and immunopositivity related to cytotoxicity, by means of gene expression profiling and immunohistochemical studies, respectively [34–37]. In our study, perforin was validated by immunostaining of the neoplastic cells rimming the adipocytes as well as by means of RT-PCR.

What makes this study of particular interest is that the comparative group was LEP, which represents the main differential diagnosis of SPTCL. In our study, we found distinctive gene expression of LEP, including the B-cell and the plasma cell signatures, consistent with previous observations in chronic cutaneous LE compared with normal skin [38]. These findings are in line with those of conventional ancillary techniques that seek plasma cells and clusters of B-cells to endorse a LEP histopathological diagnosis.

The overexpression of genes involved in mast cell pathways found in our study highlights a putative role for these cells in the pathogenesis of LEP [39]. While the involvement of mast cells in allergic/inflammatory IgE-mediated reactions has been characterized in detail, the role of mast cells in autoimmune diseases is less well understood [40]. However, evidence of IgE

involvement in autoimmune diseases is accumulating [41,42]. In our study, tryptase (encoded by *TPSAB1/B2*) showed different morphology of the mast cells in SPTCL compared to LEP cases. Further studies are needed to clarify the role of mast cells in LEP.

Only three cases presented HPS, two SPTCL (cases 5 and 6) and one of LEP (case 1). When comparing the gene expression of SPTCL cases with and without HPS, we noted only two DEGs. The first was *S100A12*, which encodes calgranulin C, an S100 family member expressed by neutrophils and macrophages, and that is a systemic marker of inflammation [43]. The second DEG was *GYPC*, which encodes glycophorin C, a transmembrane protein of red cells. Further studies are needed to determine whether our findings may help to predict the development of HPS in SPTCL.

The fact that unsupervised analysis categorizes 80% of the overlapping cases in the LEP group cluster is remarkable and suggests that the biological background of these challenging cases may usually be closer to LEP. Compared with LEP cases, the overlapping cases showed 18 DEGs and had a weaker signature of mast cells, p53, neutrophils, IGF1, G1, cell cycle, macrophages M2, proliferation, RACCCYCD, NOTCH, and RELA pathways (Figure 4). However, no statistically significant differences were found for the other pathways analyzed. One of the cases responded better to antimalarials, which are widely used to treat LEP, than to prednisone (partial response) or methotrexate (no response). Two additional cases were successfully treated with antimalarials.

There are two major limitations in this study that could be addressed in future research. First, the sample size was small because of the rarity of SPTCL and the requirement for high quality extracted RNA. However, also because the condition is rare, the findings of this study offer new, potentially useful information about the molecular background of SPTCL. Second, it is a retrospective study, with the attendant difficulties of obtaining clinical data.

In conclusion, our transcriptional studies indicate that there are specific and shared genetic underpinnings relevant to SPTCL and LEP; and that most overlapping cases resemble LEP. The SPTCL group was defined by the cytotoxicity, type 1 immune response, and CD8+ exhaustion molecular signature, whereas the LEP group was defined by mast cells, B-cells, the PLC, NF- κ B, VEGF, p53, and CXCR4 pathways, and the dendritic cell signature. Our study provides a solid molecular basis for further studies to identify novel diagnostic and prognostic markers, and potential targets of value to future therapeutic approaches.

Disclosure statement

Miguel Ángel Piris declares the following conflicts of interest: Millennium/Takeda: Advisory Board, Lecture Fees, Research Funding; Celgene: Advisory Board; Gilead: Advisory Board; Research funding; Jansen: Advisory Board; Lecture Fees; Nanostring: Advisory Board; Kyowa Kirin: Advisory Board; Kura: Research Funding. None of the other authors reports any conflict of interest.

Funding

This work was supported by a grant to SMRP from the Instituto de Salud Carlos III, from the Ministry of Science and Innovation of Spain, PI17/2172. Fondos FEDER.

ORCID

Salma Machan  <http://orcid.org/0000-0001-8490-7547>

Nerea Segues  <http://orcid.org/0000-0003-4663-1046>

Maria Ángeles Torres-Nieto Torres  <http://orcid.org/0000-0002-4240-1422>

References

- [1] Bosisio F, Boi S, Caputo V, et al. Lobular panniculitis infiltrates with overlapping histopathologic features of lupus panniculitis (lupus profundus) and subcutaneous T-cell lymphoma: a conceptual and practical dilemma. *Am J Surg Pathol*. 2015;39(2):206–211.
- [2] He A, Kwatra SG, Kazi N, et al. Atypical lymphocytic lobular panniculitis: an overlap condition with features of subcutaneous panniculitis-like T-cell lymphoma and lupus profundus. *BMJ Case Rep*. 2016;2016:bcr2016215335.
- [3] Magro CM, Crowson AN, Kovatich AJ, et al. Lupus profundus, indeterminate lymphocytic lobular panniculitis and subcutaneous T-cell lymphoma: a spectrum of subcuticular T-cell lymphoid dyscrasia. *J Cutan Pathol*. 2001;28(5):235–247.
- [4] Papalas JA, Wang E. Clinical and histopathologic overlap between subcutaneous panniculitis-like T-cell lymphoma with systemic features and small cell CD8+ ALK+ systemic anaplastic large cell lymphoma with cutaneous involvement. *J Cutan Pathol*. 2016;43(5):480–481.
- [5] Petri M, Fu W, Ranger A, et al. Association between changes in gene signatures expression and disease activity among patients with systemic lupus erythematosus. *BMC Med Genomics*. 2019;12(1):4.
- [6] Pincus LB, LeBoit PE, McCalmont TH, et al. Subcutaneous panniculitis-like T-cell lymphoma with overlapping clinicopathologic features of lupus erythematosus: coexistence of 2 entities? *Am J Dermatopathol*. 2009;31(6):520–526.
- [7] Hahtola S, Burghart E, Jeskanen L, et al. Clinicopathological characterization and genomic aberrations in subcutaneous panniculitis-like T-cell lymphoma. *J Invest Dermatol*. 2008;128(9):2304–2309.

- [8] Fernandez-Pol S, Costa HA, Steiner DF, et al. High-throughput sequencing of subcutaneous panniculitis-like T-cell lymphoma reveals candidate pathogenic mutations. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2019;27(10):740–748.
- [9] Gayden T, Sepulveda FE, Khuong-Quang D-A, et al. Germline HAVCR2 mutations altering TIM-3 characterize subcutaneous panniculitis-like T cell lymphomas with hemophagocytic lymphohistiocytic syndrome. *Nat Genet*. 2018;50(12):1650–1657.
- [10] Li Z, Lu L, Zhou Z, et al. Recurrent mutations in epigenetic modifiers and the PI3K/AKT/mTOR pathway in subcutaneous panniculitis-like T-cell lymphoma. *Br J Haematol*. 2018;181(3):406–410.
- [11] Polprasert C, Takeuchi Y, Kakiuchi N, et al. Frequent germline mutations of HAVCR2 in sporadic subcutaneous panniculitis-like T-cell lymphoma. *Blood Adv*. 2019;3(4):588–595.
- [12] Sonigo G, Battistella M, Beylot-Barry M, et al. HAVCR2 mutations are associated with severe hemophagocytic syndrome in subcutaneous panniculitis-like T-cell lymphoma. *Blood*. 2020;135(13):1058–1061.
- [13] Maliniemi P, Hahtola S, Ovaska K, et al. Molecular characterization of subcutaneous panniculitis-like T-cell lymphoma reveals upregulation of immunosuppression- and autoimmunity-associated genes. *Orphanet J Rare Dis*. 2014;9:160.
- [14] Peñate Y, Servitje O, Machan S, et al. The first year of the AEVD primary cutaneous lymphoma registry. *Actas Dermosifiliogr*. 2018;109(7):610–616.
- [15] Jaffe ES, Gaulard P, Cerroni L. Subcutaneous panniculitis-like T-cell lymphoma. WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. Lyon: International Agency for Research on Cancer; 2008. p. 383–385.
- [16] van Dongen JJM, Langerak AW, Brüggemann M, et al. Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936. *Leukemia*. 2003;17(12):2257–2317.
- [17] Groenen PJTA, Langerak AW, van Dongen JJM, et al. Pitfalls in TCR gene clonality testing: teaching cases. *J Hematop*. 2008;1(2):97–109.
- [18] Tsang H-F, Xue VW, Koh S-P, et al. NanoString, a novel digital color-coded barcode technology: current and future applications in molecular diagnostics. *Expert Rev Mol Diagn*. 2017;17(1):95–103.
- [19] Subramanian A, Tamayo P, Mootha VK, et al. Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(43):15545–15550.
- [20] Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*. 2001;29(9):e45.
- [21] Salhany KE, Macon WR, Choi JK, et al. Subcutaneous panniculitis-like T-cell lymphoma: clinicopathologic, immunophenotypic, and genotypic analysis of alpha/beta and gamma/delta subtypes. *Am J Surg Pathol*. 1998;22(7):881–893.
- [22] Willemze R, Jansen PM, Cerroni L, et al. Subcutaneous panniculitis-like T-cell lymphoma: definition, classification, and prognostic factors: an EORTC Cutaneous Lymphoma Group Study of 83 cases. *Blood*. 2008;111(2):838–845.
- [23] Bosisio FM, Cerroni L. Expression of T-follicular helper markers in sequential biopsies of progressive mycosis fungoides and other primary cutaneous T-cell lymphomas. *Am J Dermatopathol*. 2015;37(2):115–121.
- [24] Fixemer J, Hummel JF, Arnold F, et al. Eomes cannot replace its paralog T-bet during expansion and differentiation of CD8 effector T cells. *PLoS Pathog*. 2020;16(9):e1008870.
- [25] Szabo SJ, Kim ST, Costa GL, et al. A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. *Cell*. 2000;100(6):655–669.
- [26] Lauffer F, Jargosch M, Krause L, et al. Type I immune response induces keratinocyte necroptosis and is associated with interface dermatitis. *J Invest Dermatol*. 2018;138(8):1785–1794.
- [27] Hsi AC, Lee SJ, Rosman IS, et al. Expression of helper T cell master regulators in inflammatory dermatoses and primary cutaneous T-cell lymphomas: diagnostic implications. *J Am Acad Dermatol*. 2015;72(1):159–167.
- [28] Iqbal J, Wright G, Wang C, et al. Gene expression signatures delineate biological and prognostic subgroups in peripheral T-cell lymphoma. *Blood*. 2014;123(19):2915–2923.
- [29] Amador C, Greiner TC, Heavican TB, et al. Reproducing the molecular subclassification of peripheral T-cell lymphoma-NOS by immunohistochemistry. *Blood*. 2019;134(24):2159–2170.
- [30] Pearce EL, Mullen AC, Martins GA, et al. Control of effector CD8+ T cell function by the transcription factor eomesodermin. *Science*. 2003;302(5647):1041–1043.
- [31] Atreya I, Schimanski CC, Becker C, et al. The T-box transcription factor eomesodermin controls CD8 T cell activity and lymph node metastasis in human colorectal cancer. *Gut*. 2007;56(11):1572–1578.
- [32] Querfeld C, Leung S, Myskowski PL, et al. Primary T cells from cutaneous T-cell lymphoma skin explants display an exhausted immune checkpoint profile. *Cancer Immunol Res*. 2018;6(8):900–909.
- [33] Fife BT, Pauken KE. The role of the PD-1 pathway in autoimmunity and peripheral tolerance. *Ann N Y Acad Sci*. 2011;1217:45–59.
- [34] Dey-Rao R, Sinha AA. Genome-wide transcriptional profiling of chronic cutaneous lupus erythematosus (CCLE) peripheral blood identifies systemic alterations relevant to the skin manifestation. *Genomics*. 2015;105(2):90–100.
- [35] Fogagnolo L, Soares TCB, Senna CG, et al. Cytotoxic granules in distinct subsets of cutaneous lupus erythematosus. *Clin Exp Dermatol*. 2014;39(7):835–839.
- [36] Tsuzaka K, Nozaki K, Kumazawa C, et al. DNA microarray gene expression profile of T cells with the splice variants of TCRzeta mRNA observed in systemic lupus erythematosus. *J Immunol*. 2006;176(2):949–956.
- [37] Wang L, Wu L-F, Lu X, et al. Integrated analyses of gene expression profiles digs out common markers for rheumatic diseases. *PLoS One*. 2015;10(9):e0137522.

- [38] Sinha AA, Dey-Rao R. Genomic investigation of lupus in the skin. *J Investig Dermatol Symp Proc.* 2017; 18(2):S75–S80.
- [39] Kaczmarczyk-Sekuła K, Dyduch G, Kostański M, et al. Mast cells in systemic and cutaneous lupus erythematosus. *Pol J Pathol.* 2015;66(4):397–402.
- [40] Bulfone-Paus S, Bahri R. Mast cells as regulators of T cell responses. *Front Immunol.* 2015;6:394.
- [41] Maurer M, Altrichter S, Schmetzer O, et al. Immunoglobulin E-mediated autoimmunity. *Front Immunol.* 2018;9:689.
- [42] Sanjuan MA, Sagar D, Kolbeck R. Role of IgE in autoimmunity. *J Allergy Clin Immunol.* 2016;137(6):1651–1661.
- [43] Meijer B, Gearry RB, Day AS. The role of S100A12 as a systemic marker of inflammation. *Int J Inflamm.* 2012; 2012:1–6.

ANEXO 2. GRUPOS DE GENES DE LAS VÍAS DE SEÑALIZACIÓN ESTUDIADAS MEDIANTE GSEA

Vías de señalización	Genes
CG-célula B	<i>BCL6, CD38, CR1, CR2, MME</i>
CG-célula Th	<i>RORC, NOS2, ARG1, PDCD1, NOS3, MS4A1, ICOS, GPR18, FYN, CXCL13, CD69, CD84, BCL6</i>
Diferenciación de célula T CD8	<i>GPR18, HLA-DPA1, MYC, TET1, TET2, XCL1/2, CMKLR1, ENTPD1, IDH1, IDH2, GZMM</i>
CD en reposo	<i>HLA-DRB1, IL3RA, ADGRE1, CD68</i>
MHC-II	<i>HLA-DPA1, HLA-DPB1, HLA-DQA1, HLA-DQB1, HLA-DRB1, HLA-DPB2, HLA-DQA2, HLA-DQB2, LAG3, B2M</i>
MHC-I	<i>KIR2DS2, KIR3DL2, NCR1, CD1A, SIGLEC8, KIR2DL3, KIR3DL1</i>
Señalización de citocinas de células T	<i>CD69, CXCR4, ITGAX, PIM1, TNF, CD163, CD244, CD209, PTGER4</i>
Señalización de célula B y célula T	<i>CD69, CXCR4, IL10, IL21R, IL4, ITGAM, MYC, TNF, CD1A, CD63, FCRL2, LMP2, IL13, GYPC</i>
Señalización CD40 durante el desarrollo del CG	<i>BCL6, CD38, CR2, HLA-DPB1, HLA-DQA1, HLA-DQB1, HLA-DRB1, ICAM1, PNOC, TNF, HLA-DPB2, HLA-DQA2, HLA-DQB2, MUM1, CSF3R, CD209</i>
Genes regulados al alza por myc	<i>MYC</i>
Firma KRAS2	<i>HSD11B1</i>
Dianas de BCL6	<i>CD69, CXCR4, IRF4, CXCR3, LMP2</i>
Vía BLIMP-1	<i>BCL6, CD19, CR2, FCER2, GPR18, HLA-DPA1, HLA-DPB1, HLA-DQA1, HLA-DRB1, MS4A1, MYC, SPIB, HLA-DPB2, HLA-DQA2, HLA-DQB1, HLA-DQB2, IRF4, CUL3</i>
Dianas de CMYC	<i>CDK2, CDK4, CDK6</i>
Dianas de IRF3	<i>CXCR3, CD1A, CMKLR1, TMEM173</i>
Dianas de XBP1	<i>ITGAM</i>
Apoptosis CCG	<i>CTSW</i>
Vía de señalización BCR	<i>CTSW, KIT</i>
Vía de las caspasas	<i>PRF1, TMEM173, FOXM1, GZMM</i>
Vía CCR5	<i>CXCL12, CXCR4, XCL1/2, FPR2</i>
Vía del ciclo celular	<i>CDK2, CDK4, CDK6, MIB1, MKI67, PCNA, MYC</i>
Vía CREB	<i>MIB1, FPR2, PI3KCA</i>
Vía CXCR4	<i>ALK, CXCL12, HIF1A, AKT1, CD34, NANOG, MTOR</i>
Vía de muerte	<i>CXCL12, AKT1, CUL3, FOXM1</i>

Marcadores de CD	<i>HTLV, CXCR4, PIK3CA, EDN1, CCL13, CD209, HSD11B1</i>
Vía ECM	<i>CD68, tax, PIK3CA</i>
Vía ERK5	<i>Env</i>
Vía ERK	<i>AKT1, TMEM173</i>
Vía FAS	<i>FYN, PI3KCA</i>
Vía IFN	<i>MYC, PIK3CA, CD63, CPA3</i>
Vía IGF1	<i>BZLF1, S100A12, CXCR5, MUC1, TNFRSF8, CCR3, SDC1, RNASE3, CD274, KIT, IL6, PDCD1LG2, IL13, FOXM1</i>
Vía MAPK	<i>HSD11B1, NCAM1, CD274, EGR2, VEGFC, IL3RA, FPR2, KDR, FCER2, CSF3R, PDCD1LG2, CCL13, ICAM1, CD163, PDGFRA, IL21R, CCR7, VCAM1, BCL6, CD84, FPR1, FCGR3B, HIF1A, PDCD1, CD5, TNFRSF8, CMKLR1, CD19, FCAR, CXCR5, IL13, ITGAM, CXCL13, ITGAX, NOS3, PRF1, MME, DNMT3A, CXCL12, DDX3X, EDN1, S100B, SIGLEC8, TNFRSF17, EPB42, NANOG, CDK4, TMEM173, MYC, CD7, CD8A</i>
Vía MET	<i>ENTPD1</i>
Vía MTOR	<i>PI3KCA, PTEN, AKT1, MTOR, PIM1, PIM2</i>
Vía NOTCH	<i>AKT1, MYC, TGFB1, SP1, IKBKB, IL17A, ALK, BLK, S100A12, EDN1, IL17F, CXCR5, TMOD1, TNFRSF8, FCAR, CCR3, SDC1, BZLF1, RNASE3, CD274, CCL13, PTRPC, FPR2, KIT, SLC2A1, IL6, RORC, CD6, PDCD1LG2, MPO, IL13, FOXM1</i>
Vía PKC	<i>FCER2, PTEN, CSF3R, PI3KCA</i>
Vía PLC	<i>HTLV, MTOR, PTEN, MTOR, LMP2, SIK3, GATA3, MS4A2, MS4A4A, PI3KCA</i>
Vía RACCYCD	<i>FPR2, TP63, CD63, SDC1, GATA3, GNLY, MS4A2, MS4A4A</i>
Vía RELA	<i>AKT1, IL13, ENPP3, tax, env</i>
Vía STAT3	<i>TNF, AKT1, ALK, BLK, KIR2DS2, KIR3DL2, XCL1/2, CD2, EDN1, TRGC1/2*, FCAR, CCR3, FPR2, KIT, CEACAM3, PI3KCA</i>
CCG estromal	<i>HDC, PI3KCA</i>
Vía TALL1	<i>ALK</i>
Vía TGFB	<i>TNFRSF17, CSF3R, BATF3, TNFRSF8, KIT, IL6, RORC, IL13</i>
Vía TNFR1	<i>TGFB1, IL17A</i>
Vía TOLL	<i>TP63, IL17F, HTLV, LMP1, LMP2, CCL13, tax, env</i>
Vía VEGF	<i>TET1, TET2, IDH1, IDH2, NT5E</i>
Vía WNT	<i>NOS3, TNF, ASCL2</i>
Vía p38-MAPK	<i>MAP3K14, RASGRP1, TGFB1</i>
Vía p53-hipoxia	<i>TGFB1, MYC, HIF1A, KDR, ANGPT1, PDGFRA, TEK, VCAM1, SDC1, PI3KCA</i>
Vía p53	<i>AKT1, TP63, DDX3X, MUC1, SDC1, GATA3, FOXM1, MS4A2, MS4A4A</i>

Vía G1	<i>HIF1A, MYC, S100A12, SIGLEC5, CCR3, BZLF1, LMP1, LMP2, NOS2, GATA3, RORC, FOXM1, B3GAT1, NT5E, MS4A2</i>
Vía G2	<i>TGFB1, BATF3, NOS2, ARG1</i>
Vía NF-κB alternativa	<i>FOXM1, CD4</i>
Stemness	<i>CUL3, FOXM1, NT5E, CD34, NANOG</i>
Lym stemness	<i>CXCR4, S100A12, FOXM1</i>
Homeobox	<i>CD69, EOMES, SIGLEC5, CD2, DDX3X, IRF4, TPSAB1/B2, CXCR5, MUC1, TNFRSF8, BZLF1, BMLF1, HTLV, NOS2, TMEM173, SLC2A1, IL6, SIK3, FOXM1, CEACAM3, tax, env</i>
Receptor de células T (TCR)	<i>ICAM1, MYC, NANOG, PTEN, RHOA, TET1, TET2, HBG, HBB, FPR1, PTGS2, CMKLR1, IDH1, IDH2, FAM30A, ITK, TRBC1/2*, TRGC1/2*</i>
Vía PTEN	<i>AKT1, CD209</i>
Vía AKT	<i>AKT1, B2M</i>
Vía PI3K	<i>AKT1, CD38, FYN, ICOS, IKBKB, IKBKG, IL10, IL4, PDCD1, RASGRP1, RHOA, TCL1A, TNF, VAV1, MTOR, BLK, FYN, FCGR3B, S100A12, KIR2DS2, CD2, TRGC1/2*, TRBC1/2*, TBX21, CD1A, LAG3, CD274, HTLV, LMP2, CMKLR1, PTRPC, GATA3, RORC, CD6, PDCD1LG2, IL13, KLRK1, tax, env, MS4A2, MS4A4A, CPA3, PTGER4, PI3KCA</i>
Vía PTDINS	<i>AKT1, PI3KCA, PTEN, CPA3</i>
Vía de señalización fosfatidil-inositol	<i>AKT1, ALK, TET1, TET2, SIGLEC5, CD2, EDN1, TRGC1/2*, TRBC1/2*, CXCR5, MUC1, TNFRSF8, CD274, CMKLR1, PTRPC, KIT, SLC2A1, IL6, PDCD1LG2, FOXM1, IDH1, IDH2, CPA3</i>
Vía GSK3	<i>AKT1, PTEN, PIM2, ALK, CD2, EDN1, TRGC1/2*, TRBC1/2*, MUM1, CD63, CXCR5, CCR3, CD274, FPR2, KIT, SLC2A1, IL6, PDCD1LG2, IL13, FOXM1, PI3KCA</i>
Polycomb	<i>AKT1</i>
Vía RAC1	<i>PI3KCA, PIM2, TRGC1/2*, ENPP3, XCL1/2, PTEN, HSD11B1, CD2, PI3KCA</i>
Vía RHOA	<i>CD2, EDN1, DDX3X, TRGC1/2*, TRBC1/2*, CUL3, CXCR5, PI3KCA</i>
Vía NF-κB clásica	<i>CEACAM3, TET1, TET2, IDH1, IDH2, FAM30A</i>
Células B	<i>BLK, CD19, FAM30A, MS4A1, PNOC, SDC1, SPIB, TCL1A, TNFRSF17</i>
CD plasmacitoides	<i>CMKLR1, IL3RA, SP1</i>
CD foliculares	<i>FCER2, CXCL13, CR2, FCER2, CD68</i>
CD8 exhaustas	<i>CD244, EOMES, LAG3, PTGER4, TBX21, PDCD1, IL10</i>
Eosinófilos	<i>ADGRE1, CCR3, CD69, CR1, HLA-DRB1, ICAM1, ITGAM, RNASE3, SIGLEC8</i>
Monocitos	<i>S100A12, SIGLEC5, CD2, DDX3X, TRGC1/2*, TRBC1/2*, IRF4, PTGS2, CXCR5, MUC1, TNFRSF8, BZLF1, BMLF1, NOS2, TMEM173, SLC2A1, IL6, SIK3, FOXM1, CEACAM3, NKG7</i>

M0	<i>CD163, CD68, CD84, ENTPD1, ITGAX, MPO, NOS2, NOS3, NT5E, PTGS2, TMEM173, ARG1</i>
M1	<i>CD38, FCRL2, FPR2, GPR18</i>
M2	<i>EGR2, IL13, IL4, MYC, TGFB1</i>
Mastocito	<i>CD63, CPA3, ENPP3, HDC, IL10, KIT, MS4A2, TNF, TPSAB1/B2</i>
Neutrófilos	<i>CEACAM3, CSF3R, FCAR, FCGR3B, S100A12, SIGLEC5</i>
Célula NK	<i>KIR2DS2, KIR3DL2, NCR1, XCL1/2</i>
Células NK CD56 (bright)	<i>IL21R, KIR2DL3, KIR3DL1</i>
Proliferación	<i>CDK2, CDK4, CDK6, DNTT, E2F1, MIB1, MKI67, PCNA</i>
Reticulocitos	<i>EPB42, GYPC, HBB, HBG</i>
Células T	<i>CD3D, CD3E, CD3G, CD6, SH2D1A, TRAT1</i>
Células T citotóxicas	<i>CCR3, CEACAM3, CTSW, GNLY, GZMA, GZMB, GZMH, GZMM, IKBKB, IL13, KLRB1, KLRD1, KLRK1, MPO, NKG7, PRF1, RHOA, TIA1</i>
Genes mutados en linfomas de células T	<i>CARD11, DDX3X, DNMT3A, IDH1, IDH2, NOTCH1, PLCG1, RHOA, SYK, TET1, TET2, TNFRSF1B, VAV1</i>
Células Th17	<i>IL17A, IL17F, RORC, CD4</i>
Células T reguladoras (Treg)	<i>FOXP3, CD4, TGFB1, IL10, CMKLR1</i>
Vascular	<i>ANGPT1, KDR, PDGFRA, TEK, VCAM1, VEGFC</i>
Origen Th1-like	<i>TBX21, CXCR3, CCR5</i>
Origen Th2-like	<i>GATA3</i>
Células Th folicular (Tfh)	<i>BCL6, CXCL13, CXCR5, ICOS, MME, PDCD1</i>
Modificadores epigenéticos	<i>TET2, DNMT3A, PTEN, CD274 (PD-L1), LAG3, CXCL12, HDAC3, HDC, RHOA</i>

CD, célula dendrítica; CG, centro germinal; M, macrófago; MHC, del inglés *major histocompatibility complex*, complejo mayor de histocompatibilidad; Th, del inglés *T helper*; T colaborador

ANEXO 3. ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1. CRITERIOS CLÍNICOS Y ANALÍTICOS DEL SÍNDROME HEMOFAGOCÍTICO.....	24
TABLA 2. DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL DEL LINFOMA T PANICULÍTICO Y PANICULITIS LÚPICA.....	36
TABLA 3. DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL DE LINFOMA T PANICULÍTICO CON OTROS LINFOMAS, ADAPTADO DE LA CLASIFICACIÓN DE LA OMS 2016 [1].	37
TABLA 4. DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL DE LINFOMA T PANICULÍTICO Y LINFOMA DE CÉLULAS T GAMMA/DELTA CUTÁNEO PRIMARIO, ADAPTADO DE WILLEMZE ET AL [19].	39
TABLA 5. INMUNOTINCIONES DE LINFOMA T PANICULÍTICO	49
TABLA 6. INMUNOTINCIONES REALIZADAS PARA LA VALIDACIÓN.....	50
TABLA 7. SECUENCIA DE PARES DE CEBADORES Y CONDICIONES DE ARN MENSAJERO	52
TABLA 8. LISTA DE GENES INCLUIDOS EN EL PANEL CUTOMIZADO SURESELECT	54
TABLA 9. ENSAYO DE PIROSECUENCIACIÓN DE HAVCR2 Y82-R89.....	56
TABLA 10. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE NUESTROS CASOS DE LINFOMA T PANICULÍTICO (LTP), PANNICULITIS LÚPICAS (LEP) Y LOS CASOS DE SOLAPAMIENTO (OV).	59
TABLA 11. CARACTERÍSTICAS INMUNOFENOTÍPICAS Y PCR TCR DE LOS CASOS DE LINFOMA T PANICULÍTICO.....	62
TABLA 12. GSEA. VÍAS DE SEÑALIZACIÓN EXPRESADAS EN LINFOMA T PANICULÍTICO.....	65
TABLA 13. GSEA. VÍAS DE SEÑALIZACIÓN EXPRESADAS EN LUPUS PANICULÍTICO	65
TABLA 14. GSEA. VÍAS MÁS RELEVANTES EN LEP CON RESPECTO A LOS CASOS DE SOLAPAMIENTO.....	67
TABLA 15. CARACTERÍSTICAS DE LAS MUTACIONES ENCONTRADAS EN 5/6 MUESTRAS DE LTP ANALIZADAS MEDIANTE NGS Y PIROSECUENCIACIÓN*.	75

ANEXO 4. ÍNDICE DE FIGURAS

FIG. 1. ESQUEMA DE MUESTRAS DE PACIENTES Y TÉCNICAS EMPLEADAS.	47
FIG. 2. SECUENCIAS DE CEBADORES USADOS PARA AMPLIFICACIÓN DE PCR Y PIROSECUENCIACIÓN PARA LA DETERMINACIÓN DEL ESTADO MUTACIONAL DE HAVCR2 (LONGITUD DEL AMPLICON = 155 P.B.).	55
FIG. 3. A. MAPA DE COLOR DEL ANÁLISIS NO SUPERVISADO DE 22 MUESTRAS. CADA FILA CORRESPONDE A UNA MUESTRA DE TEJIDO, Y CADA COLUMNA CORRESPONDE A LA EXPRESSION DE RNA DE UN GEN. B. DENDROGRAMA ASOCIADO AL HEATMAP DE A QUE MUESTRA EL AGRUPAMIENTO EN LA MISMA RAMA (A) DE TODOS LOS CASOS DE LTP (VERDE), AGRUPAMIENTO EN DOS GRUPOS DE LOS CASOS DE LEP (NARANJA), UNO INDEPENDIENTE (C) Y OTRO MÁS CERCANO A LOS CASOS DE LTP (B). CUATRO DE LOS CINCO CASOS DE SOLAPAMIENTO (OV, AMARILLO) SE AGRUPARON CON LOS CASOS DE LEP Y UN CASO SE AGRUPÓ CON LOS DE LTP.	63
FIG. 4. MAPA DE COLOR DEL ANÁLISIS SUPERVISADO COMPARANDO EL LINFOMA T PANICULÍTICO (LTP, EN VERDE) Y EL LUPUS PANICULÍTICO (LEP, EN NARANJA) MOSTRANDO 60 GENES REGULADOS AL ALZA (CUADRO AZUL, ARRIBA A LA DERECHA) Y 30 GENES REGULADOS A LA BAJA (CUADRO NARANJA), ABAJO A LA DERECHA). CADA UNO DE LOS GENES REGULADOS AL ALZA APARECEN EN TONALIDADES DE ROJO Y LOS REGULADOS A LA BAJA EN TONALIDADES DE AZUL.	64
FIG. 5. GSEA QUE MUESTRA QUE LAS VÍAS MÁS IMPORTANTE DEL LINFOMA T PANICULÍTICO SON AQUELLAS RELACIONADAS CON LAS CÉLULAS T CITOTÓXICAS Y LAS CÉLULAS T (A); Y AQUELLAS MÁS RELEVANTES EN LUPUS PANICULÍTICO SON AQUELLAS RELACIONADAS CON CÉLULAS B, PLC, NK-KAPPA BETA CLÁSICA, VEGF, P53, P53-HIPOXIA, CXCR4 Y CÉLULAS DENDRÍTICAS (B).	66
FIG. 6. A. MAPA DE COLOR COMPARANDO LOS CASOS DE SOLAPAMIENTO CON LOS CASOS DE LUPUS PANICULÍTICO (LEP) MOSTRANDO LOS GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESADOS ($P < 0,05$). B. GSEA MOSTRANDO LAS VÍAS MÁS RELEVANTES EN LEP CON RESPECTO A LOS CASOS DE SOLAPAMIENTO: MASTOCITOS, P53, NEUTRÓFILOS, IGF1, G1, CICLO CELULAR, M2, PROLIFERACIÓN, RACCYCD, NOTCH, P53-HIPOXIA Y RELA.	67
FIG. 7. GSEA MOSTRANDO UN ENRIQUECIMIENTO DE LOS GENES RELACIONADOS CON LOS LINFOCITOS T CITOTÓXICOS EN LOS LINFOMAS T PANICULÍTICOS CON RESPECTO A LOS CASOS DE SOLAPAMIENTO DE FORMA SIGNIFICATIVA ($P < 0.05$).	69

FIG. 8. GSEA DE LAS VÍAS MÁS RELEVANTES DE LOS CASOS DE SOLAPAMIENTO CON RESPECTO A LOS LTP.....	69
FIG. 9. HEATMAP COMPARANDO LOS CASOS DE LTP Y LEP CON SHF (A, VERDE) FRENTE A LOS CASOS DE LTP Y LEP SIN SHF (B, NARANJA). LOS GENES SOBREENEXPRESADOS (EN ROJO) EN LOS CASOS ASOCIADOS A SÍNDROME HEMOFAGOCÍTICO (SHF) SON ADGRE1, S100A12, FPR2, CD274, FPR1, BATF3 Y MME.	70
FIG. 10. MAPA DE COLOR MOSTRANDO QUE S100A12 Y GYPC ESTÁN SOBREENEXPRESADOS EN LOS CASOS DE LTP CON SÍNDROME HEMOFAGOCÍTICO (A, VERDE) CON RESPECTO A LOS CASOS SIN SÍNDROME HEMOFAGOCÍTICO (B, NARANJA).	71
FIG. 11. FIGURA REPRESENTATIVA DE LA EXPRESIÓN DE PERFORINA, PD-1 Y T-BET. A. TINCIÓN CON PERFORINA QUE MUESTRA POSITIVIDAD DEL INFILTRADO LOBULILLAR EN LA PANORÁMICA. A MAYOR DETALLE, PERFORINA TIÑE LAS CÉLULAS NEOPLÁSICAS QUE RODEAN A LOS ADIPOCITOS. B. POSITIVIDAD PARA PD-1 DEL INFILTRADO LOBULILLAR. NÓTESE EN EL DETALLE LA POSIVIDAD DE LAS CÉLULAS NEOPLÁSICAS QUE BORDEAN LOS ADIPOCITOS Y LAS CÉLULAS QUE SE HALLAN ENTRE LOS ADIPOCITOS. C.POSITIVIDAD DE T-BET DEL INFILTRADO LOBULILLAR. A MAYOR DETALLE, SE OBSERVA POSITIVIDAD DE LAS CÉLULAS NEOPLÁSICAS BORDEANDO A LOS ADIPOCITOS Y LAS CÉLULAS QUE SE ENCUENTRAN ENTRE LOS ADIPOCITOS.	72
FIG. 12. A. ANALÍISIS MEDIANTE RT-PCR CUANTITATIVA DE LA EXPRESSION DE ARN MENSAJERO DE EOMES EN LAS MUESTRAS DE LINFOMA T PANICULÍTICO. B. ANALÍISIS MEDIANTE RT-PCR CUANTITATIVA DE LA EXPRESIÓN DE ARN MENSAJERO DE PRF1 EN LAS MUESTRAS DE LINFOMA T PANICULÍTICO (*P < 0.05).....	72
FIG. 13. REPRESENTACIÓN DEL ESTATUS MUTACIONAL DE NUESTROS CASOS DE LTP (SPTCL). EN EL CUADRO DE LA IZQUIERDO, EN VERDE, MUTACIONES MISSENSE, Y EN NARANJA, MUTACIÓN EN 3'UTR. EN AZUL, MUTACIÓN DE HAVCR2 POR PIROSECUENCIACIÓN. A LA DERECHA DIAGRAMA EN ROSQUILLA DE LAS MUTACIONES ESTUDIADAS CON SUS RESPECTIVOS PORCENTAJES.	74
FIG. 14. MUTACIONES DETECTADAS POR NGS EN NUESTROS CASOS DE LINFOMA T PANICULÍTICO. SE REPRESENTAN LA LOCALIZACIÓN DE LA MUTACIÓN EN RELACIÓN CON LOS DOMINIOS Y LA POSICIÓN DE LOS AMINOÁCIDOS.	76
FIG. 15. ANÁLISIS MEDIANTE PIROSECUENCIACIÓN. SECUENCIA DE DNA DEL GEN HAVCR2 TIPO SALVAJE (ARRIBA) Y MUTACIÓN Y82C (ABAJO).	77

ANEXO 5. INFORME DEL COMITÉ DE ÉTICA DE LA INVESTIGACIÓN

INFORME DEL COMITE DE ÉTICA DE LA INVESTIGACION

Dra. Lucía Llanos Jiménez, Secretario del COMITE DE ÉTICA DE LA INVESTIGACION DE LA FUNDACION JIMENEZ DIAZ

CERTIFICA:

Que en la reunión del CEIm-FJD que tuvo lugar el 13 de febrero de 2018 (acta nº 03/18) se evaluó el estudio referido y, ha decidido, una vez revisadas las respuestas a las aclaraciones menores solicitadas:

A P R O B A R

La propuesta para que se realice el estudio titulado: **"Linfoma T paniculito y simuladores. Marcadores moleculares de diagnostico y terapia dirigida"** PI17/02172

Además, hace constar que:

1. En dicha reunión se cumplieron los requisitos establecidos en la legislación vigente –Real decreto 1090/2015 y Decreto 39/94 de la CAM– para que la decisión del citado CEIm sea válida.
2. El Estudio reúne las normas éticas estándar de nuestra Institución para la realización de este tipo de estudios.
3. Se cumplen los preceptos éticos formulados en la Orden SAS 3470/2009 y la Declaración de Helsinki de la Asociación Médica mundial sobre principios éticos para las investigaciones médicas en seres humanos y en sus posteriores revisiones, así como aquellos exigidos por la normativa aplicable en función de las características del estudio.
4. El CEImFJD, tanto en su composición como en sus procedimientos, cumple con las normas de BPC (CPMP/ICH/135/95) y con la legislación vigente que regula su funcionamiento, y que la composición del CEIm FJD es la indicada en el anexo I, teniendo en cuenta que en el caso de que algún miembro participe en el estudio o declare algún conflicto de interés no habrá participado en la evaluación ni en el dictamen.
5. Asimismo, hacemos constar que existe contraprestación económica para el centro, según convocatoria de la ayuda.
6. Además, este comité recuerda la obligación de realizar el seguimiento del estudio de acuerdo a la legislación vigente.

Lo que firmo en Madrid a 21 de mayo de 2018


Dra. Lucía Llanos Jiménez
Secretaria Técnica CEImFJD

Conocido y conforme:


Alberto Montero Manso
Area Gestión Investigación

Vº Bº


Juan Antonio Alvaro de la Parra
Gerente FJD

PIC021-18_FJD

Anexo I COMPOSICIÓN DEL CEIm

Presidente	Dr. Javier Bécares Martínez. Farmacéutico de FJD.
Vicepresidenta	Dra. Macarena Bonilla Porras. Farmacéutica de FJD
Secretaria Técnica	Dra. Lucía Llanos Jiménez. Farmacóloga de la FJD
Vocales	Dr. Nicolás Alejandro Alba. Médico Asistencial. Oftalmología de FJD
	Dra. Miriam Blanco Rodríguez. Médico Asistencial. Pediatría de FJD
	Dr. Alfonso Cabello Ubeda. Médico Asistencial. Medicina Interna FJD
	Dr. Raúl Córdoba Mascuñano. Médico Asistencial. Hematología FJD
	Dra. Ana Díez Alcántara. Farmacéutico de Atención Primaria. Dirección Asistencial Noroeste
	Dra. Isabel Egocheaga Cabello. Médico de Atención Primaria. CS Isla de Oza
	Dña. Ana García Díaz, abogada
	Dr. Bernard Gastón Doger de Speville. Médico Asistencial. Oncología FJD
	Dr. Sergio Hoyos Simón. Médico Asistencial. Oncología HRJC
	Dña. María del Mar Jiménez del Castillo. DUE de la FJD
	D. Carlos Macía de la Asunción. Lego no vinculado a la Institución
	Dra. Dolores Martínez Pérez. Médico Asistencial. Cirugía Maxilofacial de FJD
	Dr. Gonzalo Pizarro Sánchez. Médico Asistencial. Cardiología HUQM
	Dra. María Socorro Rodríguez Pinilla. Médico Asistencial. Anatomía Patológica de la FJD
	Dr. Francisco Javier Ruiz Hornillos. Miembro Comité de Investigación y Miembro del Comité de Ética Asistencial. Médico Asistencial. Alergología del HIE
	Dra. Olga Sánchez Pernaute. Médico Asistencial. Reumatología de la FJD

Anexo II

CENTROS E INVESTIGADORES PRINCIPALES Y COLABORADORES

Título: “Linfoma T paniculito y simuladores. Marcadores moleculares de diagnóstico y terapia dirigida” PI17/02172

Fecha de actualización del anexo II: **21 de mayo de 2018**

INVESTIGADOR PRINCIPAL	INVESTIGADORES COLABORADORES	CENTROS DE REALIZACIÓN
Socorro Maria Rodriguez Pinilla	Luis Requena Caballero Carlos Santonja Garriga Rebeca Manso Alonso María Esther Martín Aparicio Nerea Carvajal García Salma Machan X Raúl Córdoba Mascuñano	Fundación Instituto de Investigación Sanitaria FJD Fundación Jiménez Díaz

PIC021-18_FJD

C/ Isaac Peral, 42 Oficinas, Oficina 1. 28015-Madrid
Teléfono: 91 5443720 - e-mail: ceic@fjd.es